

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Pierre HUET

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Première Thèse

ACTION DES PRODUITS THYROÏDIENS ET DU Ca^{++} SUR LES MITOCHONDRIES ISOLÉES

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le

1968, devant la Commission d'examen

JURY

MM. R. MICHEL
E. COURTOIS
Y. RAOUL

Président

Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554024_0020

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Pierre HUET

Pharmacien
Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Première Thèse

ACTION DES PRODUITS THYROÏDIENS ET DU Ca^{++} SUR LES MITOCHONDRIES ISOLÉES

Deuxième Thèse

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le

1968, devant la Commission d'examen

JURY	{	MM. R. MICHEL	}	Président
		E. COURTOIS		Examineurs
		Y. RAOUL		

DACTYLO-SORBONNE

8, Rue Casimir - Delavigne
PARIS VI^e

P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E

D E P H A R M A C I E D E P A R I S

A D M I N I S T R A T I O N

MALANGEAU P.	DOYEN,
GUILLOT M.	Assesseur, O +
DELAVEAU P.	Assesseur
RODINEAU L.	Secrétaire Général, +
FERRARI (Mme S.)	Attaché Principale
JEANDEL L.	Attaché,
ESPINASSE (Mme M.L.)	Attaché,
BRENN A.	Attaché, +
JACOB A.	Attaché, +
MUR (Mme A.M.)	Attaché,
FRIZOL (Mlle E.)	Attaché
TRICAN J.	Attaché

P R O F E S S E U R S H O N O R A I R E S

LAUNOY L.	O +,
FLEURY P.	O +,
PICON M.	O +,

P R O F E S S E U R S

JANOT M.M., O +, Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G., O + ...	Pharmacodynamie (T)
PARIS R., + ...	Matière Médicale (T)
GUILLOT M., O +, ...	Physique (T)
GAUTIER J.A., O +, ...	Chimie Organique (T)
LAMBIN (M ^{le} S.) +, ...	Microbiologie (T)
RAOUL Y., +, ...	Physiologie (T)
COURTOIS J., + ...	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L., O +, ...	Chimie Générale et Minérale (T)
TRUHAUT R., O +, ...	Toxicologie (T)
MORETTE A., + , ...	Hydrologie (T)
CÀVIER R. +, ...	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A., +, ...	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R., +, ...	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A., ...	Virologie et Sérolo- gie (T)
PIETTE M., +, ...	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M., +, ...	Biochimie Appliquée(T)
DILLEMANN G., ...	Législation, Déontologie et Histologie de la Pharmacie (T)
DEYSSON G., ...	Botanique (T)
MICHEL R., ...	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
Le HIR A.	Pharmacie Galénique(T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiologie
LARUELLE P.	Physique
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie

MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
Le MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie Animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie organique
GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie analytique et Bromatologie
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.)	Chimie générale et Minérale
HAZEBROUCQ (F.F.)	Physique
ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
MESTRE J. (F.F.)	Botanique

BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie générale et minérale

C H E F S D E T R A V A U X P R A T I Q U E S
- - - - -

AGNERAY J.	Chimie Biologique
ASTIN C. (F.F.)	Physique
BLANC (Mme J.)	Chimie Organique
BARNIER (Mme S.)	Mathématiques
BESANCON (F.F.)	Mathématiques
BOURNIQUE (Mle C.) (F.F.)	Physiologie végétale
BERNARD (Mle J.)	T.P.Microbiologie 4e année
BIGET (Mme M.P.)	Mathématiques
CARLIER A.	C.E.S.Pharmacie Galénique Indus- trielle
CENAC (Mme J. (F.F.)	C.E.S.Parasitologie Pharmaceuti- que et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)	Chimie Préparation
CHOIX (Mle M.)	Pharmacie Galénique
CLAIR (Mle G.) (F.F.)	Essais des Médicaments Végétaux
DAGRON C.	Chimie Organique
DELCOURT A.	Botanique
COMPAGNON P. (F.F.)	Chimie Organique
DAVY J. Mme (F.F.)	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mle M.T.)	Parasitologie
DREUX C.	C.E.S Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mle G.)	C.E.S.Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUPONT (Mme C)	Pharmacodynamie
ETIENNE G.	Pharmacie Galénique
FLEURY (Mle S.)	E.D.Chimie Analytique
FOGLIETTI (Mle M.J.)	Chimie Biologique
GOURSAT (Mle M.J.) (F.F.)	Botanique
GAYRAL P. (F.F.)	T.P.Zoologie

HAMON M.	Chimie Analytique
HARISPE J. +, ...	Chimie Organique
HENRY J.	Chimie
HUBERT (Mme J.)	C.E.S.Bactériologie Pharmaceutique et Technique
JUND (Mle Y.)	C.E.S. Immunologie Générale et Ap- pliquée
JULIEN R. (F.F.)	Chimie Minérale 1ère Année
LAROCHE J.	Physique
LEBOEUF M. (F.F.)	C.E.S.Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEGER (Mme N.)	Parasitologie
LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
Le DUC (Mme Y.)	T.P.Chimie 4e Année
LELUC R.	Microbiologie
LEMONNIER A.	Chimie Analytique
LEVILLAIN P.	Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	Physique
LONGEVIALE (Mle M.)	Botanique
MACCARIO J. (F.F.)	Mathématiques
MANDEREAU J.	C.E.S.Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MAHUZIER J. (F.F.)	Chimie Analytique
MARTIN-FRERE H.	Chimie Générale et Minérale 1e Année
MICHELET A. (F.F.)	Chimie Minérale
MORIN (Mle H.)	C.E.S.Pharmacodynamie et essais bio- logiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F.)	Physique
NOTTEGHEM (Mme M.) (F.F.)	Zoologie
NGUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S.Toxicologie et Etudes Sanitaires
PARIS M.	C.E.S.Analyse Appliquée au Contrôle des Médicaments (Biologie)
PRESTIS J.	Biologie Animale
POULLAIN P.	C.E.S.Hématologie
PRAT (Mme M.T.)	Mathématiques

RODIER N. (F.F.)	Physique
ROLLEN (Mle A.) +, ...	Botanique
ROUSSELET (Mle R.)	Essais des Drogues Végétales
ROBERT (Mme M.)	C.E.S.Immunologie Générale et Appliquée
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée
SEILLER (Mme M.) (F.F.)	Pharmacie Galénique Industrielle
STRUPLER (Mle N.)	Chimie Générale et Minérale
TRUONG CONG TRIEU	Chimie Analytique
TROUPEL (Mme S.) (F.F.)	Chimie
VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D.Chimie Organique
VILLERS J. (F.F.)	Physique

B I B L I O T H E Q U E

- - - - -

RUYSSEN (Mle Y.)	Conservateur en Chef +,
LAVAUD (Mle S.)	Conservateur +,
DESGRIPPES (Mme A.)	Conservateur
BOUVRESSE (Mle A.M.)	Bibliothécaire

+ Légion d'Honneur
O Officier
C Commandeur

A mes Parents

En témoignage de ma reconnaissance

A ma femme et à ma fille

A toute ma famille

A tous ceux qui me sont chers

A Monsieur le Recteur Jean ROCHE

Professeur au Collège de France

Qui a bien voulu nous accueillir dans
son laboratoire et suivre notre travail
avec tant de bienveillance

En témoignage de notre profond respect
et de notre sincère reconnaissance

A notre Maître

Monsieur, le Professeur Raymond MICHEL

Professeur d'Endocrinologie à la
Faculté de Pharmacie de Paris

Qui nous a confié ce travail et permis,
par ses précieux conseils, de le mener
à bien

Qu'il veuille bien trouver ici un
témoignage de notre profonde reconnaissance

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS

A Monsieur le Professeur L. RAOUL

Professeurs à la Faculté de Pharmacie de Paris

Nous les remercions de l'accueil qu'ils nous
ont réservé, de l'intérêt qu'ils ont bien
voulu porter à ce travail et de l'honneur
qu'ils nous ont fait en acceptant de faire
partie de notre jury de thèse

A Madame Odette MICHEL

Dont l'amitié et les conseils nous ont été si
précieux dans l'accomplissement de ce travail

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression
de notre profonde gratitude

A tous nos Amis du Collège de France
et du Laboratoire de Chimie Pharmaceutique de
la Faculté de Médecine et de Pharmacie de DIJON

Pour l'aide qu'ils nous ont généreusement
apportée

ACTION DES PRODUITS THYROÏDIENS
ET DU Ca^{++} SUR LES MITOCHONDRIES ISOLEES

-:-

INTRODUCTION

-:-

La glande thyroïde sécrète essentiellement deux produits doués d'une activité hormonale : la thyroxine ou 3:5:3':5'-tétraiodo-L-thyronine (T_4) et la 3:5:3'-triiodo-L-thyronine (T_3). Ces substances libérées dans la circulation générale sont fixées sur certaines protéines plasmatiques spécifiques (thyroxine binding protéines ou TBP) de nature globulinique ou préalbuminique (144, 166, 184). Le complexe hormonal plasmatique que l'on représente habituellement par le symbole $TBPT_4$ et $TBPT_3$ se dissocie en TBP et hormones libres T_4 ou T_3 , lesquelles franchissent alors la membrane cellulaire et sont prises en charge par de nouvelles protéines fixantes de nature mal connue (160) avant de se localiser sur les différentes particules cytoplasmiques. Au cours de recherches in vitro on a pu montrer d'une part qu'il n'existe pas de captation préférentielle sur l'une d'entre elles et d'autre part que l'addition du surnageant provenant de l'ultracentrifugation d'un homogénat cellulaire à des particules ayant fixé des iodothyronines, les détache de leurs sites de fixation (182). Néanmoins les mitochondries isolées de différents tissus sont susceptibles de retenir des concentrations relativement élevées de produits iodés (74, 141, 149, 180).

A l'exception de quelques organes comme l'hypophyse, le foie (3, 70, 173, 182), la répartition hormonale tissulaire est également peu spécifique. Or, comme l'administration d'hormones à un animal se traduit par des effets multiples qui ne se

manifestent qu'après un temps de latence, il convenait de trouver un dénominateur commun à l'ensemble de ces phénomènes dont l'une des manifestations essentielles et qui est la plus facile à suivre est l'augmentation du métabolisme de base. Pour expliquer ce délai d'action, on a supposé que les hormones devaient se transformer avant d'agir en une forme active, laquelle pouvait provenir d'un de leurs métabolites, c'est une des raisons pour lesquelles des recherches systématiques sur le métabolisme des iodothyronines ont été entreprises. De l'ensemble de ces travaux, il ressort que parmi les voies du catabolisme hormonal, trois ont particulièrement retenu l'attention.

La première considérait que la deshalogénéation partielle de T_4 en T_3 constituait le processus d'activation (58, 102, 107, 108, 178, 179). Or il semble qu'il n'a jamais été possible de prouver de façon certaine la biosynthèse de T_3 au niveau cellulaire aux dépens de T_4 (145).

La deuxième plus récente consiste en une décarboxylation de T_4 ou de T_3 donnant naissance aux amines correspondantes, lesquelles faciliteraient l'action inhibitrice de l'adrénaline sur l'intestin isolé (148). Dans ce cas, il ne peut s'agir que d'un effet particulier des hormones thyroïdiennes et non d'une réponse générale.

Dans la troisième enfin, on a montré que la désamination des iodothyronines, vraisemblablement par transamination, conduit aux dérivés pyruviques correspondants, lesquels sont ensuite transformés par décarboxylation oxydative en leurs dérivés acétiques, acides 3:5:3':5'-tétraiodothyroacétique (TA_4) ou 3:5:3'-triiodothyroacétique (TA_3) (116, 4, 9, 48, 196, 147, 146). Ceux-ci perfusés à dose physiologique à l'animal, provo-

quent une augmentation précoce mais fugace de la consommation d'oxygène, tandis que T_3 et T_4 sont inefficaces dans ces conditions (187, 188). Cependant, l'administration répétée de TA_3 se traduit par une activité métabolique nettement inférieure à celle des hormones dont ils dérivent. Aussi s'est-on demandé si TA_3 ne provoquait pas une sécrétion secondaire d'amines adrénergiques, lesquelles seraient responsables du phénomène. Ainsi aucune de ces hypothèses n'est vraiment satisfaisante et ce temps de latence observé chez l'animal reste encore inexpliqué.

Les hormones thyroïdiennes exercent des activités biologiques extrêmement diversifiées. Ainsi, elles contrôlent des fonctions très différentes telles que la thermorégulation, l'activité respiratoire, la croissance, le développement du système nerveux, elles interviennent également dans le métabolisme des protéines, des lipides, des hydrates de carbone, des anions et des cations et modifient les réponses de l'organisme à certaines hormones; or si les différentes manifestations physiologiques des iodothyronines sont maintenant bien établies, il n'en est pas de même pour leur mécanisme d'action.

Les travaux sur le mode d'action hormonal ont suivi l'évolution générale des recherches biologiques. Entrepris d'abord sur l'animal entier, ils ont consisté pour certains (143, 174) à mettre en évidence les interactions de la T_4 et du système nerveux sympathique. Mais les résultats contradictoires obtenus n'ont pas permis de retenir comme cause fondamentale la sensibilisation des récepteurs nerveux comme on l'avait cru initialement. D'autres recherches physiologiques telles que celles portant sur une relation avec les vitamines n'ont pas été plus satisfaisantes. En effet, si un besoin augmenté en vitamine A a été constaté chez l'animal hyperthyroïdien (25, 42,

49, 50, 63), on est en droit d'admettre qu'il correspond à une demande exagérée consécutive à l'accélération de tous les métabolismes.

Plus tardivement, l'étude du mode d'action des hormones thyroïdiennes a été entreprise sur des coupes tissulaires. On a constaté que la consommation d'oxygène de coupes de rein, maintenues en survie déclinait rapidement, par contre l'addition de T_4 au milieu d'incubation maintenait plus longtemps l'activité respiratoire (8). Ce résultat a laissé supposer que les hormones thyroïdiennes exerceraient au niveau cellulaire un effet protecteur sans en préciser d'ailleurs les implications biochimiques.

Si les travaux physiologiques n'ont pas permis d'élucider le mode d'action intime des produits thyroïdiens, ils eurent néanmoins le mérite d'accréditer la conception d'un mécanisme commun à l'ensemble des propriétés de ces hormones.

Les recherches biochimiques qui ont suivi se sont orientées dans deux directions principales. Elles ont consisté à étudier d'une part les effets des produits hormonaux sur un nombre considérable de systèmes enzymatiques isolés, et d'autre part leur influence sur le fonctionnement des particules subcellulaires.

Les hormones thyroïdiennes affectent de nombreuses deshydrogénases parmi lesquelles la succinodeshydrogénase dont l'activité abaissée chez l'animal thyroïdectomisé est restaurée par la thyroxine (1, 8, 76, 170, 199). Mais dans ce cas, on ne peut pas assurer que celle-ci n'intervient pas en fixant un inhibiteur enzymatique. Par contre elle inhibe les deshydrogénases malique, glutamique, isocitrique de façon compétitive

pour la première, non compétitive pour la seconde et vraisemblablement en complexant un cation jouant le rôle de coenzyme pour la dernière (26, 77, 106, 113, 200, 201, 202, 203). En fait, les actions des iodothyronines sur les systèmes enzymatiques isolés sont très variées et souvent contradictoires, si bien qu'il n'a pas été possible de retirer d'un nombre considérable de travaux, des données permettant d'expliquer leur mode d'action.

Les recherches sur le comportement des iodothyronines et de certains de leurs dérivés naturels ou synthétiques sur les particules subcellulaires ont été entreprises au cours de ces dernières années. Leur intervention sur les noyaux de cellules hépatiques de Rat a permis d'établir que la RNA polymérase est stimulée après administration d'hormones thyroïdiennes à des Rats thyroïdectomisés (183). Ces effets permettent d'envisager qu'elles interviendraient sur le contrôle nucléaire de la synthèse des protéines cytoplasmiques (181). En outre au niveau microsomal, elles activent la biosynthèse des protéines in vitro (150, 152, 155, 171, 172). Aussi a-t-on émis l'hypothèse que l'intervention des produits thyroïdiens affecterait essentiellement la synthèse protéique soit en agissant sur le RNA messenger soit en stimulant l'incorporation des acides aminés dans les protéines. Cependant il est difficile de relier l'augmentation in vitro de la consommation d'oxygène des mitochondries isolées sous l'effet des produits thyroïdiens, à leur effet nucléaire ou ribosomal.

Les mitochondries sont susceptibles d'oxyder différents substrats hydrogénés, particulièrement ceux provenant du cycle tricarboxylique, la plupart cédant leur hydrogène au NAD ; tandis que le succinate est oxydé par l'intermédiaire d'une flavo-

protéine. Le transfert des hydrogènes et des électrons jusqu'à l'oxygène s'effectue grâce à une série de transporteurs successifs présents dans les membranes mitochondriales. L'énergie provenant de ces oxydations est mise en réserve sous forme d'ATP par phosphorylation de l'ADP (82, 91, 92, 138, 168). En présence de substrats NAD- liés, le nombre de molécules de phosphate combinées à l'ADP par atome d'oxygène consommé est normalement égal à trois, avec le succinate ce rapport P/O est égal à deux.

Or on a constaté que les mitochondries isolées d'animaux ayant reçu de fortes doses de thyroxine présentaient un rapport P/O inférieur à la normale (48, 51, 62, 63, 78, 80, 112). Cet effet qui constitue le découplage des phosphorylations articulées sur les oxydations, rappelle ce que l'on obtient avec le 2-4-dinitrophénol (DNP) que l'on considère comme l'agent découplant type (54). Cependant la dose d'hormone employée pour mettre en évidence une diminution du rapport P/O est non physiologique (17, 51, 62, 73, 79, 115), mais les quantités de T_4 peuvent néanmoins être réduites en abaissant la concentration de Mg^{++} (7, 125, 177). En outre le découplage des mitochondries isolées, par les iodothyronines demande certains prétraitements (73, 100), ou une préincubation (48) afin de faciliter leur fixation intraparticulaire. Il n'est pas impossible d'ailleurs que ces produits provoquent la fuite de certains facteurs intramitochondriaux (88, 93, 132, 142) ou comme il a été démontré pour T_3 qu'elles inhibent une ATPase soluble possédant des propriétés recouplantes (132). Selon certains, T_4 (18, 19) provoquerait la diminution du rapport P/O en inhibant les étapes ultimes de la phosphorylation ce qui la différencierait du DNP, en fait cette éventualité doit être rejetée puisque l'inhibition de la synthèse de l'ATP par l'oligomycine qui s'oppose

à la fixation du phosphate (20, 54, 131, 161, 169), est partiellement levée par les produits thyroïdiens. Comme la réaction inverse de la synthèse de l'ATP est représentée par une activité ATPasique, il n'est pas surprenant que dans certaines conditions les iodothyronines puissent l'empêcher (18, 19, 132). Un autre effet des hormones thyroïdiennes lié aux phosphorylations oxydatives a été signalé (32, 51, 62, 154). Il consiste en une diminution du contrôle respiratoire lequel est représenté par le rapport des vitesses de consommation d'oxygène des mitochondries en présence et en l'absence d'accepteur de phosphate tel que l'ADP. Ce résultat obtenu in vitro mérite d'être rapproché de celui que l'on constate avec des mitochondries musculaires isolées chez certains sujets atteints de thyrotoxicoses (55).

La biosynthèse de l'ATP n'est pas l'unique phénomène de la conservation de l'énergie lié à la respiration mitochondriale. Le métabolisme particulière de l'eau et de certains cations est également étroitement dépendant de la consommation d'oxygène. En effet, les mitochondries intactes fraîchement préparées, possédant un contrôle respiratoire élevé, conservées en milieu isotonique, ne subissent pas de changements morphologiques significatifs, alors que l'addition des hormones thyroïdiennes provoque une fixation importante d'eau (1, 11, 52, 53, 64, 74). Ce gonflement mitochondrial, induit par les produits thyroïdiens et supprimé par les différents inhibiteurs respiratoires (2, 37, 90) ainsi que par le DNP (38, 92, 101, 177), est donc sous la dépendance du transfert des électrons ainsi que de la conservation de l'énergie. Toutes les phosphorylations ne sont d'ailleurs pas nécessaires à l'effet des produits thyroïdiens sur la fixation de l'eau par les mitochondries, celle couplée au transfert des électrons au niveau du cytochrome b apparaissant seule comme privilégiée (153). On peut se demander si toutes les étapes

qui conduisent à la biosynthèse de l'ATP sont indispensables ou si seulement certaines d'entre elles le sont.

Un autre phénomène lié aux mécanismes respiratoires est la fixation de certains cations bivalents tels Sr^{++} (22, 23, 24), Mn^{++} (40, 41), Mg^{++} (159) et Ca^{++} (156, 157) par les mitochondries. Mais c'est sans aucun doute le métabolisme mitochondrial de Ca^{++} qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux, vraisemblablement en raison de l'importance biologique de cet ion.

Les mitochondries fraîchement préparées sont susceptibles de capter des quantités considérables de Ca^{++} qui précipitent dans les espaces intramitochondriaux sous forme d'hydroxyapatite (35, 46, 47, 191, 192). Cette captation nécessite de l'énergie provenant soit de l'oxydation d'un substrat hydrogéné, soit d'ATP ajouté au milieu à doses élevées (192). Chacune de ces voies énergétiques est inhibée par le DNP ainsi que par les inhibiteurs respiratoires pour la première et par l'oligomycine pour la seconde (157, 192). Cependant la captation de Ca^{++} par les mitochondries est accompagnée d'autres manifestations. Deux cas sont à envisager selon que le cation est ajouté au milieu à faible ou à forte concentration. A faible concentration, de l'ordre de 10^{-4} M, il est entièrement retenu, même en l'absence de phosphate, par les membranes mitochondriales vraisemblablement au niveau des phospholipides (41). Pendant toute la durée de l'accumulation, la consommation d'oxygène est augmentée mais elle revient à son état initial (99, 135, 165) lorsque Ca^{++} a disparu du milieu. Simultanément les coenzymes de la chaîne respiratoire évoluent vers la forme oxydée puis retrouvent l'état d'oxydoréduction qui précède l'addition de Ca^{++} (34). En somme, l'effet respiratoire du cation est très comparable à celui de l'ADP (35).

A plus fortes concentrations, de l'ordre de 10^{-3} M , et en l'absence de phosphate, la captation ne peut être totale, la consommation ne revient pas alors à son état initial et les coenzymes respiratoires se maintiennent sous forme oxydée (34). Toutefois, avec les concentrations élevées en Ca^{++} , la fixation devient très importante quand on ajoute du phosphate, Mg^{++} et de l'ATP à faible concentration, celui-ci exerçant vraisemblablement un effet protecteur vis-à-vis des structures particulières (158). Le phosphate est alors activement retenu par les particules et précipite dans les mitochondries avec Ca^{++} sous forme d'hydroxyapatite (35, 157).

Quoiqu'il en soit, si le milieu renferme un excès de Ca^{++} de façon à ce que ce dernier ne puisse être capté totalement par les mitochondries, la respiration reste accélérée et les coenzymes respiratoires oxydés. Dans ces conditions Ca^{++} se comporte comme un découplant, activant la respiration sans conservation de l'énergie et induisant même une activité ATPasique. Enfin, en présence de fortes concentrations en cation, on observe une fixation active d'eau par les mitochondries qui s'hypertrophient (43, 167, 177).

Toutes ces manifestations de Ca^{++} au niveau mitochondrial sont la conséquence d'une modification des phosphorylations oxydatives par ce cation et sont qualitativement comparables à celles des hormones thyroïdiennes. Cette similitude d'effets est peut être à l'origine des rapports étroits observés entre Ca^{++} et T_4 dans les différents états thyroïdiens.

En effet, dans l'hyperthyroïdie, la vitesse de renouvellement du tissu osseux est nettement activée, ce qui se traduit par une excrétion urinaire et fécale de calcium augmentée

et par une balance calcique négative (5, 133), fréquemment associée à une ostéoporose (126, 195) ou à une ostéite fibreuse (57). De la même façon, des études réalisées avec ^{45}Ca chez l'animal rendu hyperthyroïdien ont montré une diminution rapide de l'activité spécifique du sang (76, 103). Enfin, une hypercalcémie est parfois observée dans les cas de thyrotoxicose, le retour de la calcémie à la normale suivant l'amélioration de l'état thyroïdien (10).

Inversement dans l'hypothyroïdie, la vitesse de renouvellement du tissu osseux est nettement ralentie(5). Une relation entre le calcium et les hormones thyroïdiennes est illustrée par le fait que l'injection de celles-ci à des animaux décalcifiés expérimentalement, entraîne une stimulation de la consommation d'oxygène beaucoup plus faible que celle constatée dans le cas d'animaux normaux.

Donc non seulement on a pu mettre en évidence une intervention de la thyroxine sur le métabolisme de Ca^{++} mais aussi une interférence de l'état calcique sur les réponses respiratoires des hormones thyroïdiennes.

OBJET DU TRAVAIL

-:-

Les relations entre les hormones thyroïdiennes et le calcium n'ont fait l'objet jusqu'ici que de travaux physio-pathologiques. Nous avons signalé les quelques données biologiques apportées par les recherches expérimentales entreprises chez l'animal mais il semble que jusqu'ici aucune étude biochimique n'ait été entreprise au niveau subcellulaire sur l'influence des thyromimétiques sur le métabolisme du calcium ou réciproquement. Or il semble qu'un certain parallélisme existe entre l'action des iodothyronines d'une part et du calcium de l'autre sur les mécanismes des oxydations phosphorylantes mitochondriaux.

En l'absence d'accepteurs de phosphate, les hormones iodées et leurs métabolites acétiques ainsi que le calcium, provoquent une accélération respiratoire. En outre, les produits halogénés et ce cation favorisent la fixation active de l'eau par les mitochondries. Ces deux phénomènes qui sont étroitement dépendant des phosphorylations couplées empruntent-ils des voies semblables avec les deux types de substances ou bien la même réponse finale est-elle consécutive à des réactions différentes ?

Notre travail a eu essentiellement pour objet de comparer les effets de produits thyroïdiens et du calcium, séparément ou en association, sur diverses manifestations mitochondriales liées aux oxydations phosphorylatives. Après avoir étudié le comportement des dérivés iodés et du calcium sur la mor-

phologie des mitochondries, nous avons entrepris des recherches sur l'influence des hormones thyroïdiennes sur la captation active du calcium et enfin nous avons précisé les changements qu'elles apportaient en présence du cation à la consommation d'oxygène et à l'état d'oxydo-réduction des coenzymes respiratoires mitochondriaux.

Notre travail comporte donc trois parties. La première est consacrée à l'étude de l'action des produits thyroïdiens et de Ca^{++} sur la morphologie mitochondriale. Cette partie se subdivise elle-même en trois chapitres :

Dans les deux premiers nous exposerons les techniques générales d'étude des propriétés mitochondriales ainsi qu'une analyse de l'action inhibitrice sur les phosphorylations oxydatives d'un nouvel antibiotique que nous avons été amené à utiliser au cours de nos recherches ; enfin le troisième chapitre rassemblera nos résultats concernant l'étude comparée des effets de Ca^{++} et des produits iodés sur la morphologie mitochondriale.

L'action des produits thyroïdiens sur la captation particulière de Ca^{++} sera étudiée au cours de la deuxième partie.

Enfin la troisième partie comportera deux chapitres : le premier sera consacré aux effets de Ca^{++} et des iodothyronines, seuls ou en association, sur la respiration mitochondriale et le deuxième à ceux exercés par ces produits sur l'état d'oxydoréduction du nicotinamideadénine dinucléotide (NAD^+).

PREMIERE PARTIE

--

ACTION DES PRODUITS THYROIDIENS ET DE Ca^{++}
SUR LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE

--

INTRODUCTION

Les effets de la thyroxine et de Ca^{2+} sur les mitochondries isolées de divers tissus, présentent un certain nombre d'analogies. D'une part ces produits découplent tous deux les phosphorylations des oxydations dans les particules intactes (44), alors qu'ils sont inactifs sur les fragments mitochondriaux (176) ; d'autre part ils provoquent l'un et l'autre la fixation d'eau par ces organites, entraînant leur gonflement (43, 48, 167). Ces modifications de perméabilité des membranes particulières sont des processus actifs liés aux mécanismes des phosphorylations oxydatives (11, 127, 128, 129, 130) et doivent être distingués du gonflement et de la contraction qui apparaissent au cours des variations de la pression osmotique du milieu, (43, 111, 185). De nombreux travaux ont été consacrés aux effets de la thyroxine et de Ca^{2+} sur les structures mitochondriales, ces recherches ayant en fait pour but d'essayer d'expliquer les mécanismes des phosphorylations oxydatives.

La fixation de l'eau par les mitochondries sous l'effet de ces produits exige l'oxydation d'un substrat hydrogéné. En effet les mitochondries âgées, ayant perdu leurs substrats endogènes, ne présentent plus d'hypertrophie, cependant cette propriété est restaurée par addition de donateurs d'électrons

tels le succinate ou le β -hydroxybutyrate (37, 69, 90). Par ailleurs, la thyroxine et Ca^{2+} demeurent sans action sur la morphologie mitochondriale, en l'absence d'oxygène (68, 86), ou lorsque la respiration de ces particules est inhibée par différents agents, tels la roténone, l'antimycine A ou le KCN, (86, 90) lesquels arrêtent le transfert des électrons à des niveaux différents des chaînes respiratoires. Enfin le gonflement des mitochondries sous l'effet de l'hormone thyroïdienne et de Ca^{2+} est également sous la dépendance des phosphorylations couplées aux oxydations. En effet, la présence d'un découplant comme le 2-4-dinitro-phénol dans le milieu supprime toute action de ces produits sur la structure mitochondriale (38, 92, 101, 177).

L'activité hypertrophiante de Ca^{2+} a été étudiée en premier lieu par CLELAND et SLATER (43, 167) puis par TAPLEY (177). Cet effet dépend beaucoup de la tonicité et du pH du milieu (197) mais semble assez spécifique puisque d'autres cations bivalents tels Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , se comportent au contraire comme des inhibiteurs du gonflement mitochondrial (21, 177).

Quant à la thyroxine, ce fut également TAPLEY, COOPER, LEHNINGER (85, 175, 177), et KLEMPERER (74) qui mirent les premiers en évidence son effet sur la morphologie mitochondriale. Depuis, l'action de cette hormone fut très étudiée (117, 119, 153). A côté de celle-ci, on a montré que de nombreux composés thyroactifs se montraient capables d'induire le gonflement mitochondrial (162). C'est le cas des isomères D et L de la thyroxine, de la triiodothyronine (177), des analogues structuraux dérivés de l'acide acétique (TA_3 , TA_4) (48), et de beaucoup d'autres composés comprenant même les dérivés O-méthylés (81).

D'une façon générale les corps manifestant une activité thyroïdienne sur le métabolisme de base et sur les tests de métamorphose des amphibiens exercent également un effet sur la morphologie mitochondriale (162). Par contre, les phénols iodés dépourvus d'activité thyroïdienne, comme la 3:5-diiodotyrosine, sont sans effet sur le gonflement particulaire. En outre, des travaux récents (153) ont montré que certaines séquences de la chaîne respiratoire n'étaient pas indispensables aux effets des produits thyroïdiens, alors qu'au contraire l'étape de transfert des électrons au niveau du cytochrome b s'avérait nécessaire. De la même façon il semble que tous les intermédiaires de la synthèse de l'ATP ne soient pas impliqués dans le mécanisme mitochondrial des produits thyroïdiens. Il est toutefois nécessaire pour que cet effet s'exerce que l'étape de couplage des phosphorylations aux oxydations ne soit pas inhibée (177).

On pouvait donc se demander si l'action mitochondriale de Ca^{2+} et des hormones thyroïdiennes se manifestait dans des conditions analogues qui apparaîtraient alors nécessaires au gonflement particulaire. C'est pourquoi nous nous sommes proposés d'étudier le comportement de Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale comparativement à celui des hormones thyroïdiennes et du Iodure de cyanogène, composé se comportant d'une façon identique aux produits hormonaux sur le gonflement particulaire (117, 118, 119, 139, 140, 151). Nous avons pour cela étudié les effets de ces produits, d'une part dans des conditions permettant d'isoler certaines étapes des chaînes respiratoires et d'autre part en présence d'inhibiteurs spécifiques des phosphorylations oxydatives, ne laissant subsister que certains intermédiaires de la synthèse de l'ATP. Les inhibiteurs des phosphorylations que nous avons été amenés à utiliser sont le

2-4-dinitrophénol, l'oligomycine et un antibiotique proche de celui-ci, la rutamycine, dont nous avons au préalable étudié l'action inhibitrice sur les ATPases mitochondriales.

PREMIER CHAPITRE

-:-

TECHNIQUES GENERALES

-:-

I - Préparation des mitochondries

Les expériences consacrées à l'étude du gonflement des mitochondries, ainsi que celles de captation de l'ion Ca^{++} , exigent dans un premier temps l'obtention de ces particules non lésées présentant une structure aussi intacte que possible et une forte activité enzymatique se traduisant par un contrôle respiratoire élevé (entre 4 et 6).

Nous avons obtenu des préparations de qualité à l'aide de la méthode de SCHNEIDER et HOGEBOOM modifiée (149, 163, 164), en partant de foies de jeunes Rats mâles dont le poids était compris entre 100 et 120 grammes.

Il est nécessaire de prendre un soin particulier à la préparation de l'homogénat, la durée et la vitesse de destruction des tissus devant être établies avec précision et respectées d'un essai à l'autre. Il est en outre fondamental d'éliminer complètement au cours des différents lavages les lipides adhérant aux parois des tubes à centrifuger, ainsi que les microsomes, provoquant l'un et l'autre un gonflement spontané des mitochondries (6, 39, 198).

Les Rats mâles sont sacrifiés par section de la carotide, les foies sont rapidement prélevés et plongés dans une solution de saccharose 0,25 M maintenue à 0°C. Toutes les opérations seront effectuées dans des récipients maintenus dans de la glace pilée.

1 - Homogénéisation - Après dilacération et lavage à plusieurs reprises avec du saccharose 0,25 M, l'homogénéisation est réalisée au moyen de l'appareil de Potter à piston lâche en Téflon, fixé à un moteur tournant à 700 tours/minute. Le tissu hépatique est broyé par petites fractions pendant 10 à 15 secondes environ. Les homogénats sont ensuite réunis et amenés à un volume de 125 ml avec du saccharose 0,25 M.

2 - Séparation et lavages des mitochondries - L'homogénat est soumis à une première centrifugation à 0°C, pendant 10 minutes à 650 g. Le sédiment, constitué de noyaux, de cellules hépatiques intactes et d'hématies, est rejeté. Le surnageant est ensuite centrifugé à 12.000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors rejeté et les parois intérieures du tube à centrifuger recouvertes de lipides sont soigneusement essuyées à l'aide de papier filtre. Le culot contenant les mitochondries est remis en suspension dans environ 90 ml de saccharose 0,25 M et soumis à une centrifugation analogue. Cette opération est recommencée une nouvelle fois, en prenant soin d'éliminer, après chaque centrifugation, les lipides enduisant les parois du tube à centrifuger ; le culot mitochondrial est mis en suspension homogène dans la solution de saccharose 0,25 M en quantité telle que 1 ml de suspension corresponde à 1 g de tissu hépatique. Dans ces conditions 1 ml de suspension renferme 20 à 25 mg de protéines mitochondriales.

II - Dosage des protéines mitochondriales

La teneur en protéines de la suspension obtenue est déterminée par la réaction du Biuret, avec le réactif de Gornall (56, 84), après avoir lysé les mitochondries par incubation en présence de désoxycholate de sodium.

1 - Réactifs :

- Solution de désoxycholate de sodium :

- . Acide désoxycholique 0,200 g
- . Soude normale 1 ml
- . Eau distillée 3 ml

- Réactif de Gornall :

- . SO_4Cu , 5 H_2O 1,50 g
- . Tartrate de sodium et de potassium 6 g
- . Soude à 10 % 300 ml
- . Iodure de potassium 1 g
- . Eau distillée QSP 1000 ml

- Solution étalon de sérum albumine :

- . Sérum albumine 50 mg
- . Sérum physiologique 10 ml

2 - Mode opératoire - 0,1 ml de la suspension mitochondriale, additionné de 0,2 ml de solution de désoxycholate, est placé au B.M. à 40°C. Après 30 minutes d'incubation on complète à 1 ml avec du sérum physiologique puis on ajoute 4 ml de réactif de Gornall. On laisse la coloration se développer 30 minutes à la température du laboratoire, et on mesure la DO à 520 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre ; on se rapporte alors à une courbe d'étalonnage obtenue à partir de quantités croissantes de la solution de sérum albumine, traitées de la même façon que la suspension mitochondriale.

III - Mesure du gonflement des mitochondries

Différentes techniques ont été décrites pour suivre la cinétique de la pénétration de l'eau dans les mitochondries.

Certaines sont assez laborieuses et se prêtent mal à des mesures à temps très rapprochées. Telles sont les méthodes gravimétriques préconisées par Mac FARLANE et SPENCER (105) et par PRICE (136), ainsi que les méthodes basées sur la mesure du volume mitochondrial après centrifugation, appelées parfois mitocrite (65, 110).

D'autres, telles que celles décrites par CHANCE et PACKER (31, 59, 127), basées sur la mesure de la lumière diffusée à 90° par la suspension mitochondriale, sont extrêmement sensibles, mais nécessitent un appareillage assez complexe.

Pour notre part, nous avons suivi le gonflement des mitochondries en mesurant la densité optique, dans le visible, des suspensions mitochondriales. Cette méthode simple et suffisamment sensible, tout au moins lorsqu'il s'agit de mitochondries hépatiques de Rat, fut utilisée initialement par RAAFLAUB (137) et CLELAND (43).

Différents auteurs (75, 87, 89, 136, 185, 186, 194) comparèrent les résultats obtenus par cette méthode et par les techniques gravimétriques. Ils montrèrent que les variations de densité optique des suspensions à 520 m μ bien que ne suivant pas de façon rigoureusement proportionnelle les changements de taille des particules, permettaient d'étudier dans des conditions satisfaisantes ces modifications morphologiques.

Techniques : Deux techniques ont été adoptées.

1 - Les expériences ont été réalisées dans des tubes ca-

librés de 15 x 100 mm permettant une lecture directe à l'aide d'un spectrophotomètre BECKMAN DU.

Ces tubes contenant 5 ml d'un tampon KCl 0,125 M ; Tris-ClH 0,02 M pH 7,4 ; sont placés dans un bain d'eau à 20°C. Lorsque la température est équilibrée, on ajoute une quantité définie de la suspension mitochondriale, et on mesure la DO du mélange homogénéisé. La quantité de mitochondries ajoutée au tampon doit être telle que l'absorption initiale soit comprise entre 0,7 et 0,8 à 520 m μ . Cette quantité correspond à environ 1 mg de protéines mitochondriales. Dès la lecture effectuée, les tubes sont replacés dans le bain d'eau.

A des temps réguliers (généralement toutes les quatre minutes), les tubes sont retirés du bain d'eau, soigneusement essuyés et agités, et l'absorption mesurée.

Généralement les produits provoquant le gonflement des mitochondries (T_4 , Ca^{++} , ICN), sont ajoutés après la deuxième lecture (au temps 4 minutes), sous un faible volume (environ 0,05 ml) de façon à ce que l'effet de dilution soit négligeable. Les autres réactifs, intervenant dans les différentes expériences (substrats hydrogénés, inhibiteurs respiratoires), sont ajoutés au tampon, également sous un faible volume, avant l'addition de la suspension mitochondriale.

Nous avons été amenés à modifier la longueur d'onde habituelle, dans certaines expériences mettant en jeu des réactifs colorés, afin d'éliminer l'absorption propre de ceux-ci.

L'effet d'un produit déterminé sur la morphologie mitochondriale peut alors être représenté par une courbe (fig.1)

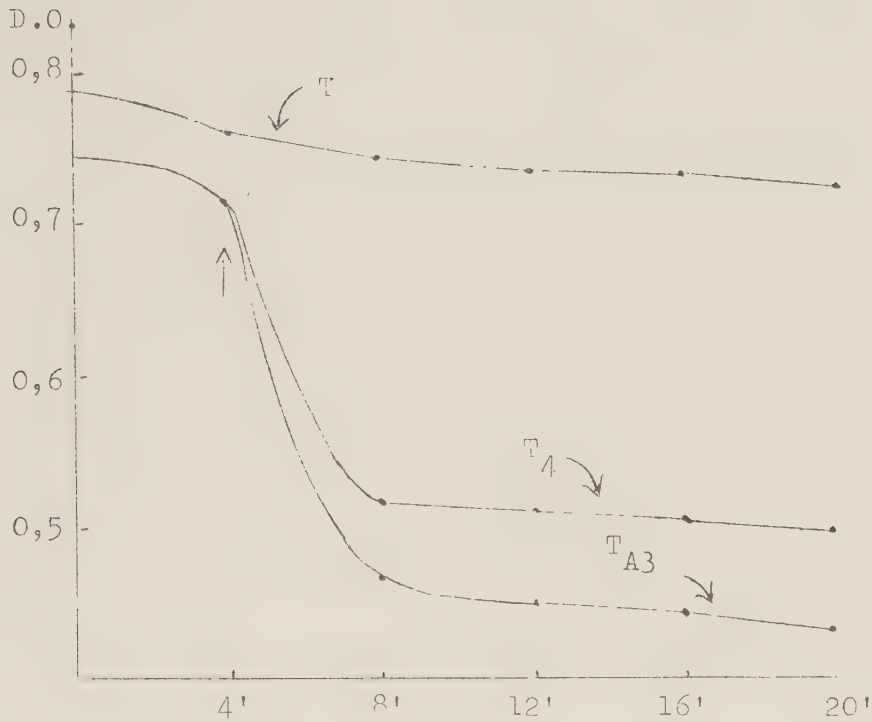


Figure 1 : Effets de T_4 et T_{A3} sur la morphologie mitochondriale. La densité optique (D.O.) à 520 m μ est mesurée toutes les 4 minutes dans des tubes contenant 5 ml de tampon Tris 0,02 M, KCl 0,125 M (pH 7,4) et 0,05 ml du produit iodé en présence de 0,05 ml de suspension de mitochondries correspondant à 1 mg de protéines. Température d'incubation $20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. T_4 et T_{A3} sont ajoutés au temps 4' à une concentration de 10^{-5} M. La courbe T = essai témoin.

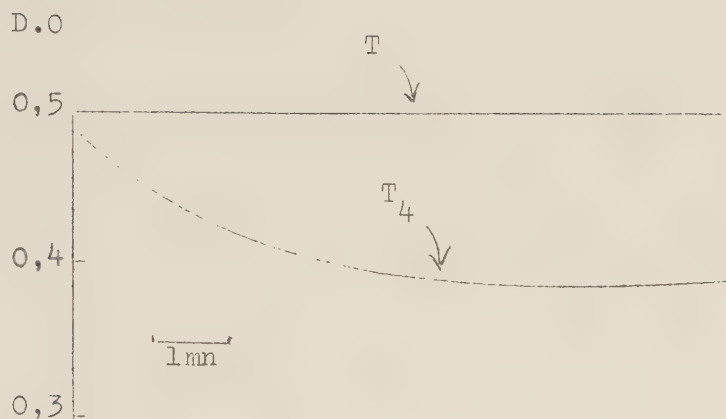


Figure 2 : Effet de T_4 ($8 \cdot 10^{-6}$ M) sur la morphologie mitochondriale. La densité optique (D.O.) à $540 \text{ m}\mu$ en fonction du temps en minutes (mn) est enregistrée automatiquement dans des cuves de 1 cm renfermant 2,5 ml de Tampon Tris additionné ou non de l'hormone, et 20 μl de la suspension mitochondriale correspondant à 0,4 mg de protéines.

sur laquelle les densités optiques (ordonnées) sont reportées en fonction du temps exprimé en minutes (abscisses).

2 - Nous avons également utilisé une méthode identique, dans son principe, à celle précédemment décrite mais permettant d'enregistrer directement les variations de turbidité de la suspension mitochondriale. Nous avons utilisé pour cela le photomètre enregistreur EPPENDORF avec passeur automatique, muni d'un filtre de 540 m μ ; les mesures ont été effectuées dans des cuves de 1 cm, contenant 2,5 ml de la solution tampon additionnée des différents produits étudiés, et 0,020 ml de la suspension stock mitochondriale, soit environ 0,4 à 0,5 mg de protéines.

Le passeur automatique permet d'effectuer une lecture de la densité optique de chacune des 6 cuves toutes les 3 minutes. Les valeurs obtenues sont directement enregistrées en fonction du temps.

Les courbes obtenues de cette façon (fig.2) sont superposables à celles auxquelles on parvient par la méthode manuelle et permettent une étude satisfaisante des variations de volume des mitochondries sous l'influence de différents agents.

DEUXIEME CHAPITRE

-:-

INFLUENCE DE LA RUTAMYCINE SUR LES ATPASES MITOCHONDRIALES

-:-

Divers antibiotiques toxiques ont été utilisés pour étudier les mécanismes des phosphorylations oxydatives. Les uns, tel l'antimycine A (2), se comportent comme des inhibiteurs respiratoires ; d'autres tel l'oligomycine, s'opposent à la synthèse de l'ATP en inhibant l'organification de PO_4^{3-} (54, 66, 83, 109, 131, 161, 169).

Récemment un nouvel antibiotique, la Rutamycine ou A 272, a été extrait de *Streptomyces Rutgersensis* (189). Ses propriétés antifongiques et physico-chimiques sont très proches de celles de l'oligomycine, mais sa composition élémentaire, son spectre UV, en diffèrent néanmoins. Nous nous sommes proposés de rechercher si la Rutamycine intervenait au niveau d'une des étapes de la synthèse de l'ATP comme le fait l'oligomycine.

Pour cela nous avons comparé l'action de ces deux antibiotiques sur les ATPases mitochondriales. Or, comme les mitochondries hépatiques intactes et fraîchement préparées n'hydrolysent pratiquement pas l'ATP, il convient, pour faire apparaître une activité ATPasique, soit d'ajouter aux suspensions particulières différents produits découplants (DNP , Mg^{++} , TA_3) (66), soit d'utiliser des fragments mitochondriaux (71). L'oligomycine inhibant l'étape d'intégration de PO_4^{3-} dans la synthè-

se de l'ATP, s'oppose à l'hydrolyse de celui-ci sous l'effet des différentes ATPases.

I - Effets de l'oligomycine et de la rutamycine sur l'hydrolyse de l'ATP par les fragments mitochondriaux

La préparation des fragments particuliers est réalisée par la technique de KIELLEY et KIELLEY (71) ; les mitochondries provenant des foies de quatre Rats sont mises en suspension dans une solution hypotonique alcaline de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H } 3.10^{-3}$ M et broyées au moyen d'un mixer rapide, deux fois consécutives pendant deux minutes. Une centrifugation de 10 minutes à 12.000 g élimine les mitochondries non lésées et les gros débris. Le surnageant est recentrifugé à 100.000 g pendant 30 minutes, et le culot obtenu est homogénéisé dans 3 ml de $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H } 3.10^{-3}$ M. Toutes les opérations sont pratiquées à + 2°C.

La préparation enzymatique d'un volume de 0,2 ml, renfermant de 1 à 3 mg de protéines est ajoutée à 1,6 ml de tampon Tris-ClH 0,02 M pH 7,2 ; ClK 0,125 M ; $\text{Cl}_2\text{Mg } 5.10^{-3}$ M ; ATP 10^{-2} M ; éthanol 2,8 %, ce dernier servant à la dissolution de doses variables d'antibiotiques. Ceux-ci sont utilisés à des concentrations croissantes exprimées en μ moles par gramme de protéines mitochondriales.

L'incubation est réalisée dans des fioles en verre de 25 ml placées dans un thermostat à 37°C, et soumises à une agitation régulière. Après 15 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 1,8 ml de ClO_4H à 5 % et le phosphate libéré est dosé par la méthode de MARTIN et DOTY (114). Les résultats expérimentaux sont exprimés en μ moles de PO_4^{3-} libérées par heure et par mg de protéines particulières.

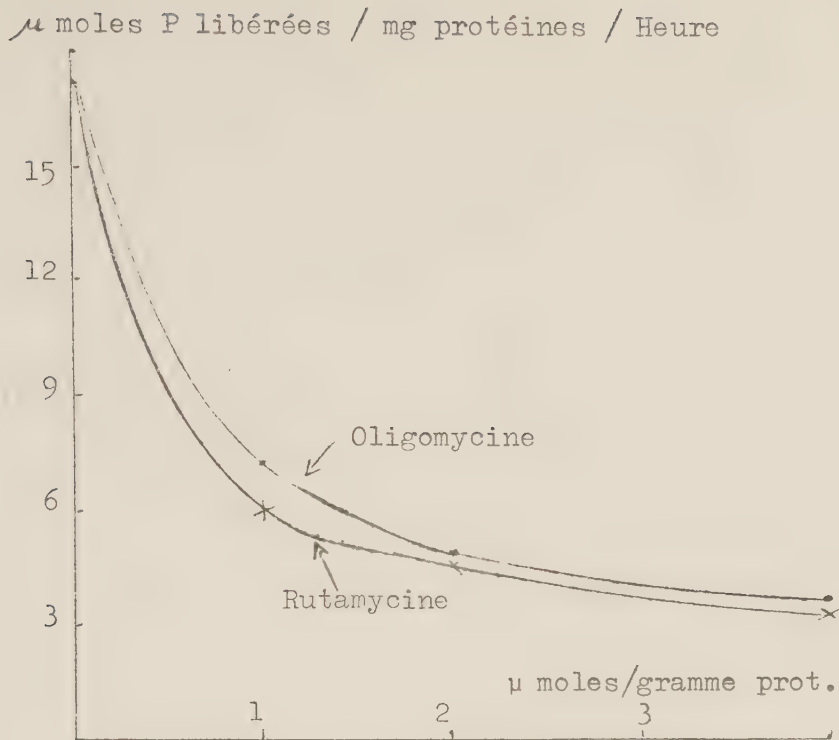


Figure 3 : Effets comparés de la rutamycine de l'oligomycine sur l'hydrolyse de l'A.T.P. par les fragments mitochondriaux préparés selon la méthode de Kielley, et Kielley, en présence de Mg Cl_2 .

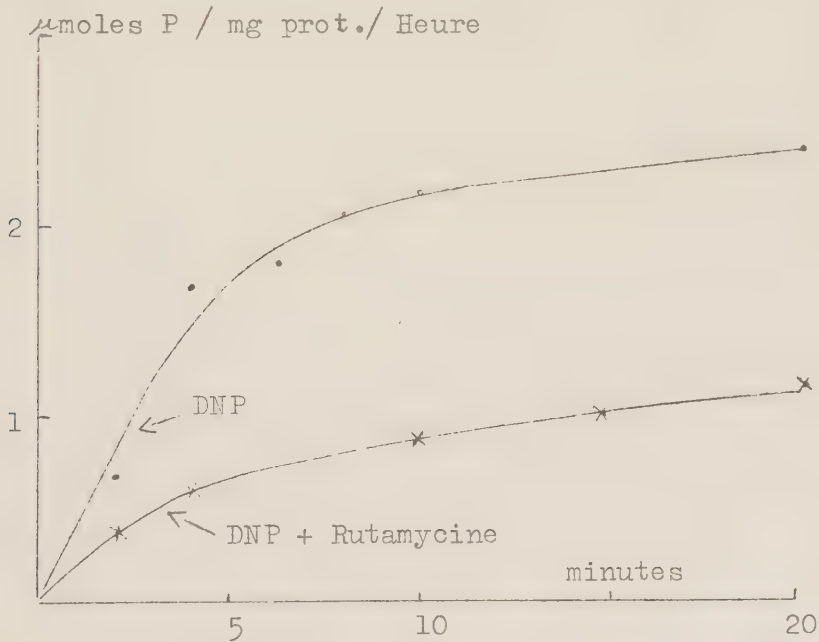


Figure 4 : Effet de la Rutamycine sur la cinétique d'hydrolyse de l'A.T.P. par les mitochondries intactes en présence de Dinitro-phénol.

La figure 3 représente les quantités de PO_4^{3-} libérées en fonction de la dose d'antibiotique. Aucune différence ne peut être notée entre l'oligomycine et la rutamycine ; il apparaît que l'un et l'autre exercent une activité inhibitrice semblable.

II - Effets de l'oligomycine et de la rutamycine sur les ATPases mitochondriales induites par différents découplants

Les mitochondries fraîchement préparées et intactes n'hydrolysent pratiquement pas l'ATP. On peut néanmoins, en ajoutant aux suspensions particulières différents produits, faire apparaître une activité ATPasique.

Nous avons étudié comparativement l'action de l'oligomycine et de la rutamycine sur les ATPases induites par addition, soit de 2-4-dinitrophénol (DNP), soit de Mg^{++} , soit encore d'acide 3:5:3'-triiodothyroacétique (TA_3).

Les conditions expérimentales sont analogues à celles mises en oeuvre pour l'étude de l'activité ATPasique des fragments mitochondriaux. L'ATP, à une concentration de 5 à $10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, sert de substrat pour les divers essais. La préparation enzymatique, d'un volume de 0,2 ml, renfermant de 2 à 5 mg de protéines, est ajoutée à 1,6 ml d'une solution renfermant :
Tris $4,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, KCl $6,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, éthanol 2,8 %, oligomycine ou rutamycine à des concentrations croissantes, et TA_3 , Mg^{2+} , ou DNP ajoutés à des concentrations que nous indiquerons ultérieurement.

Les incubations sont arrêtées par addition de 1,8 ml de ClO_4H à 5 %, après 15 minutes, sauf dans le cas des études cinétiques, où elles le sont à des temps différents.

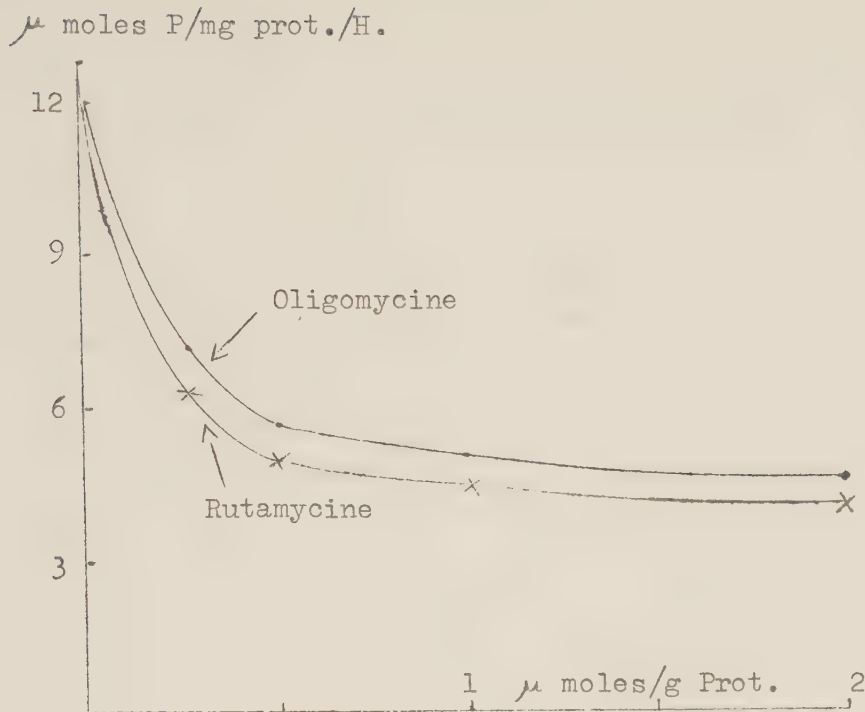


Figure 5 : Effets comparés de la Rutamycine et de l'Oligomycine sur l'activité A.T.Pasique de mitochondries hépatiques intactes en présence de $Mg Cl_2$.

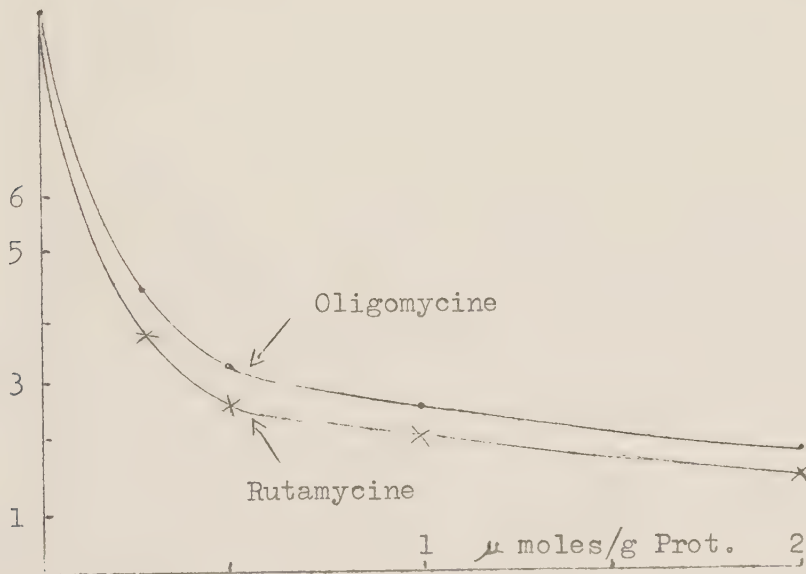


Figure 6 : Effets comparés de la Rutamycine et de l'Oligomycine sur l'hydrolyse de l'A.T.P. par les mitochondries hépatiques de rat en présence de T_{A3} .

Le comportement des antibiotiques a été étudié dans les conditions où les activités ATPasiques, qui apparaissent après addition soit de DNP, soit de Mg^{++} , soit de TA_3 , sont les plus élevées.

Le DNP utilisé à une concentration de 2.10^{-4} M à pH 7,4 et à une température de 20°C "démasque" l'activité ATPasique des mitochondries. La cinétique de l'hydrolyse de l'ATP en fonction du temps exprimé en minutes, est représentée sur la figure 4. L'addition de Rutamycine $4,5.10^{-6}$ M réduit la vitesse d'hydrolyse de près de 50 % et se comporte à cet égard comme l'Oligomycine.

Les cations bivalents, principalement Mg^{++} , permettent également de révéler l'activité ATPasique des mitochondries fraîchement préparées. Nous avons utilisé $MgCl_2$ à la concentration de $1,6.10^{-3}$ M dans des essais effectués à pH 9 et à 37°C.

La figure 5 rapporte les effets de doses croissantes d'Oligomycine et de Rutamycine sur l'activité ATPasique mitochondriale ainsi "démasquée". Ces effets sont pratiquement les mêmes dans les deux cas.

L'acide 3:5:3'-triiodothyroacétique (TA_3) ajouté à une préparation de mitochondries fraîches, confère à celles-ci une activité ATPasique. La concentration de TA_3 la plus favorable est 10^{-4} M lorsqu'on opère à 20°C et à pH 7,4. Les conditions expérimentales en présence de Rutamycine ou d'Oligomycine sont les mêmes que celles utilisées dans l'essai avec Mg^{++} .

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 6 ; ils ne traduisent aucune différence entre l'activité inhibitrice de l'un ou de l'autre antibiotique.

Il apparaît donc que l'activité ATPasique des mitochondries hépatiques de Rat fraîchement préparées, mise en évidence soit par fragmentation des particules, soit par addition de certains produits (DNP, TA_3 , Mg^{++}), est inhibée par la Rutamycine. Le comportement de cet antibiotique est dans chacun de ces cas en tous points semblable à celui de l'Oligomycine, et son effet inhibiteur est de même intensité.

Dans la suite de notre travail, nous considérerons donc que la Rutamycine agit sur la synthèse de l'ATP à la manière de l'Oligomycine en inhibant l'étape d'intégration du phosphate minéral et les deux antibiotiques seront donc employés indifféremment.

TROISIEME CHAPITRE

-:-

INFLUENCE DES PRODUITS THYROIDIENS ET DE Ca^{++} SUR LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE

-:-

I - Comparaison de l'activité des deux types de produits

Afin de rechercher quelles sont les doses actives de Ca^{2+} et de T_4 , nous avons fait des essais en ajoutant les mitochondries au tampon Tris-CLK contenant des doses croissantes de ces deux produits. La turbidité de la suspension ainsi obtenue est mesurée en enregistrant en fonction du temps la densité optique à 540 mμ .

La figure 7 donnée à titre d'exemple représente le résultat d'une telle expérience. La courbe témoin, obtenue en l'absence de Ca^{2+} et de T_4 met en évidence la stabilité des mitochondries placées dans ces conditions. Par contre, en présence de T_4 et de Ca^{2+} , respectivement aux concentrations de 8.10^{-6}M et de $2,6.10^{-3}\text{M}$, il apparaît une diminution régulière de la densité optique traduisant un gonflement des particules. Ca^{2+} manifeste son effet beaucoup plus lentement que T_4 , mais en fin d'expérience, l'intensité du phénomène est identique pour les deux produits aux doses utilisées ici. Néanmoins, on constate qu'une concentration en Ca^{2+} plus de 300 fois supérieure à celle de T_4 s'avère nécessaire pour produire le même effet.

La respiration des mitochondries, ainsi que les phosphorylations couplées étant indispensables au gonflement de ces

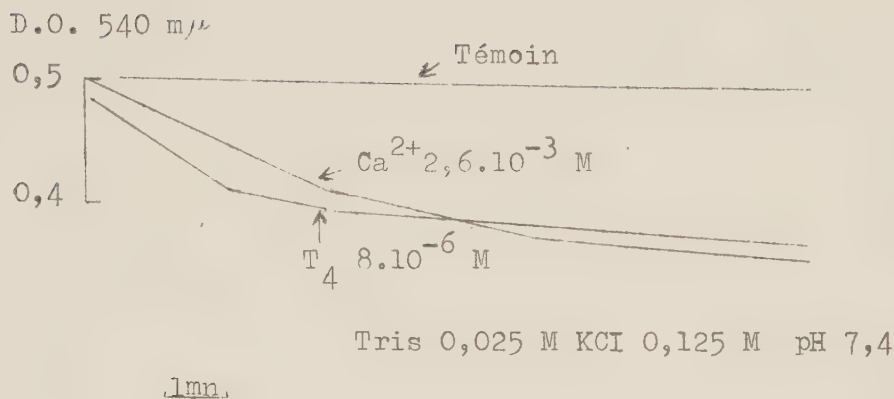


Figure 7 : Effet de T_4 ($8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) ou Ca^{++} ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) sur la morphologie de mitochondries hépatiques de rat. Conditions semblables à celles de la figure 2.

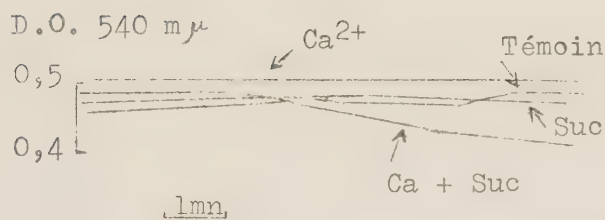


Figure 8 : Effet de Ca^{2+} ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) sur la morphologie mitochondriale en présence de Roténone 10^{-7} M avec ou sans succinate de sodium $4,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Conditions semblables à celles de la figure 2.

La figure 8 rend compte des effets de Ca^{2+} étudiés dans ces conditions. Le tampon renferme la Roténone à la concentration de 10^{-7} M. Ca^{2+} n'entraîne plus alors d'hypertrophie particulière (courbe 2) ; par contre en présence de succinate (courbe 4) il retrouve son effet habituel. Les courbes 1 et 3 attestent de la stabilité des mitochondries en l'absence de Ca^{2+} .

Des expériences identiques ont été réalisées avec T_4 et ICN, l'amytal inhibant la région NAD-Flavoprotéine. Les résultats obtenus se traduisent par les différentes courbes de la figure 9. En présence d'Amytal, T_4 et ICN n'exercent qu'une action très limitée sur la morphologie mitochondriale (A) mais après addition de succinate, ils retrouvent complètement leur effet hypertrophiant (B).

Dans les conditions opératoires utilisées, supprimant la zone NAD-Fp₂, Ca^{2+} et les produits iodés se comportent donc d'une façon identique. Les uns et les autres n'amènent aucun changement de turbidité des suspensions mitochondriales en présence d'Amytal ou de Roténone, mais provoquent le gonflement de ces particules lorsque le milieu est supplémenté en succinate. Ces faits permettent donc d'établir que la zone respiratoire NAD-Fp₂ sur laquelle s'articule la première phosphorylation P₁, n'est pas indispensable à l'effet mitochondrial de Ca^{2+} et des produits thyroïdiens.

2 - Suppression de la région Cytochrome a-a₃-O₂. Si le milieu renferme du KCN, inhibiteur du transfert des électrons au niveau de l'étape Cyt a-a₃, les mitochondries ne respirent plus et tous les coenzymes respiratoires sont à l'état réduit. L'addition de $\left[\text{Fe} (\text{CN})_6 \right] \text{K}_3$ qui accepte les électrons du Cyt c

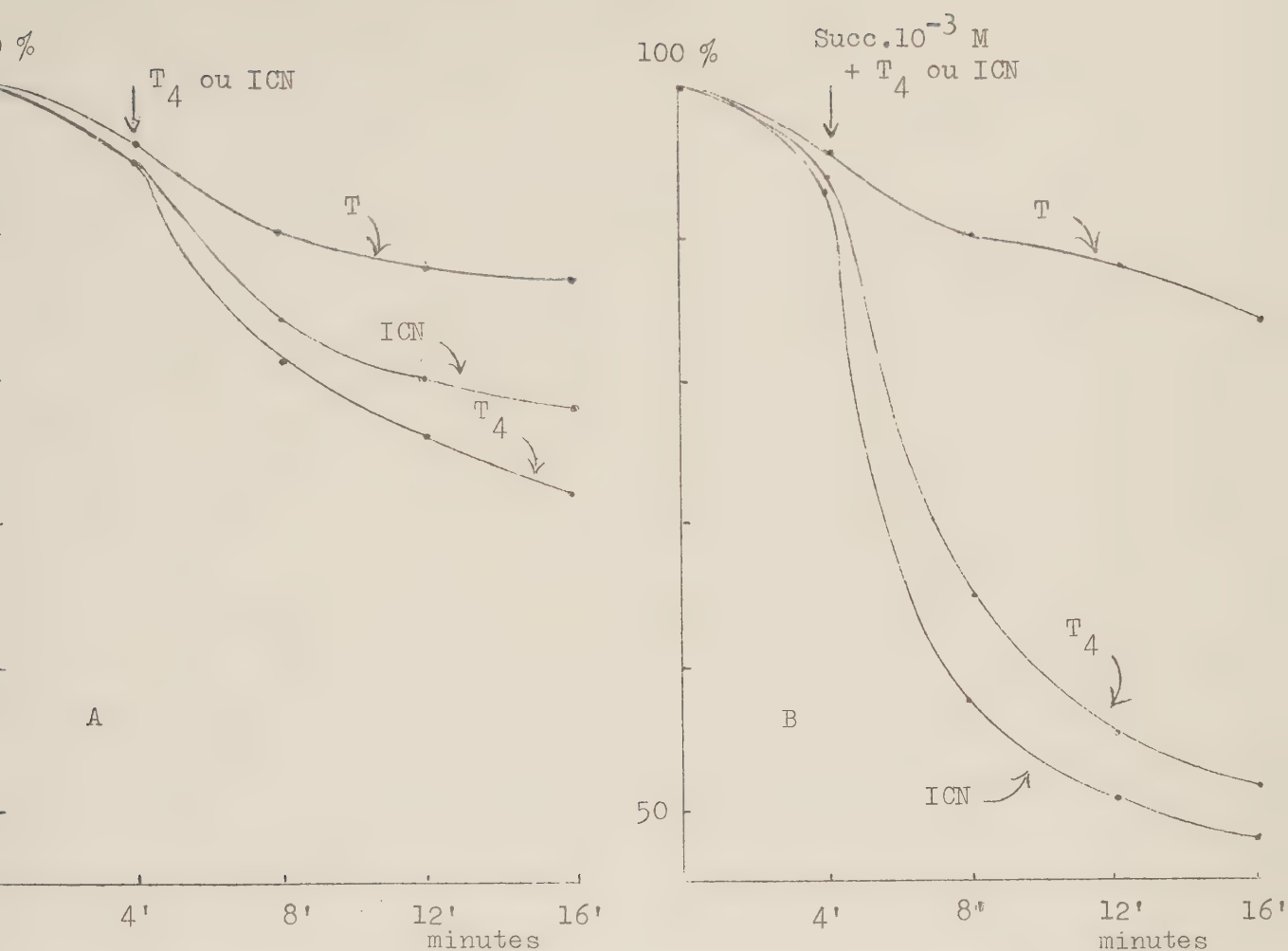


Figure 9 : Effets de T₄ et de ICN sur la morphologie mitochondriale en présence d'Amytal avec ou sans succinate de sodium. Les variations en fonction du temps en minutes de la D.O. à 520 mμ sont exprimées en % de l'absorption initiale de la suspension de mitochondries. Les produits iodés à la concentration de 5.10⁻⁶ M sont ajoutés à la 4ème minute. Le tampon Tris 0,02 M, ClK 0,125 M, pH 7,4, renferme outre de 1 i Hydroxybutyrate de sodium 10⁻³ M et de l'amytal 1,8 . 10⁻³ M. Température d'incubation = 20° ± 1°C.

A = Chaîne respiratoire inhibée par l'amytal.

B = Respiration rétablie par le succinate de sodium 10⁻³ M, ajouté à la 4ème minute.

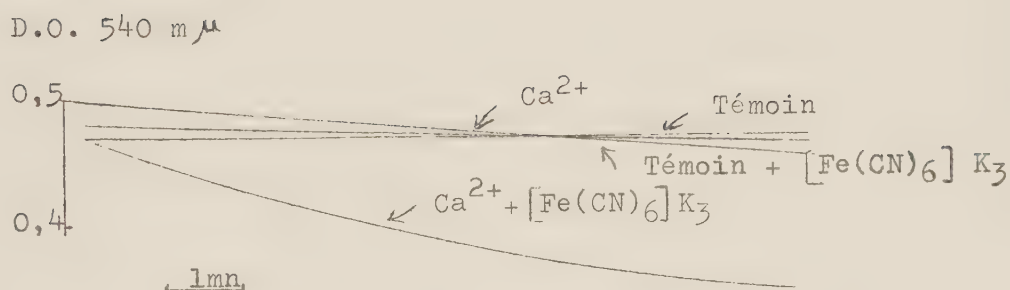
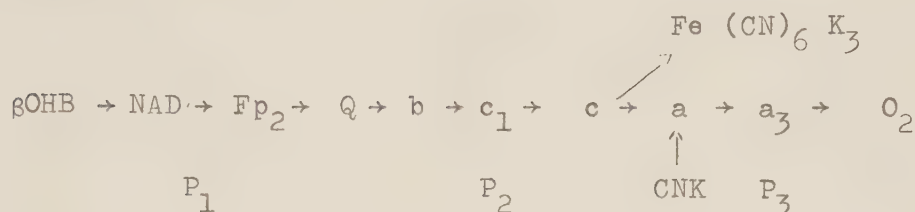


Figure 10 : Effets de Ca^{2+} ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$) sur la morphologie mitochondriale en présence de KCN $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ avec ou sans $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3$ 10^{-3}M . Conditions semblables à celles de la figure 2.

réduit, sans les transmettre à O_2 , rétablit le flux d'électrons (39). Les réactions sont représentées sur le schéma B.

SCHEMA B



Dans ces conditions seules les phosphorylations P_1 et P_2 sont couplées à l'oxydation d'un substrat hydrogéné NAD lié comme par exemple le β -hydroxy-butyrat.

Nous avons étudié l'action de Ca^{2+} sur la structure mitochondriale dans ces conditions respiratoires particulières, au cours desquelles O_2 n'intervient pas. Sur la figure 10, sont rapportés les effets de Ca^{2+} sur les mitochondries placées dans le tampon habituel supplémenté en KCN 2.10^{-3} M. La courbe 1 atteste de l'intégrité des particules. L'effet de Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale est complètement supprimé par KCN à la concentration utilisée (courbe 2), et en l'absence de Ca^{2+} , $\boxed{\text{Fe (CN)}_6} \text{ K}_3$ 10^{-3} M qui rétablit le transfert d'électrons, ne modifie pas la turbidité de la suspension (courbe 3). Par contre, l'addition simultanée de Ca^{2+} et de $\text{Fe (CN)}_6 \text{ K}_3$ entraîne une diminution régulière et importante de la densité optique de la suspension (courbe 4).

Des essais ont également été effectués dans ces conditions mais avec T_4 et ICN à la place de Ca^{2+} . Le milieu étant additionné de KCN, les produits iodés ne produisent plus qu'un effet très limité (Fig. 11 A). Par contre, le milieu étant sup-

CN

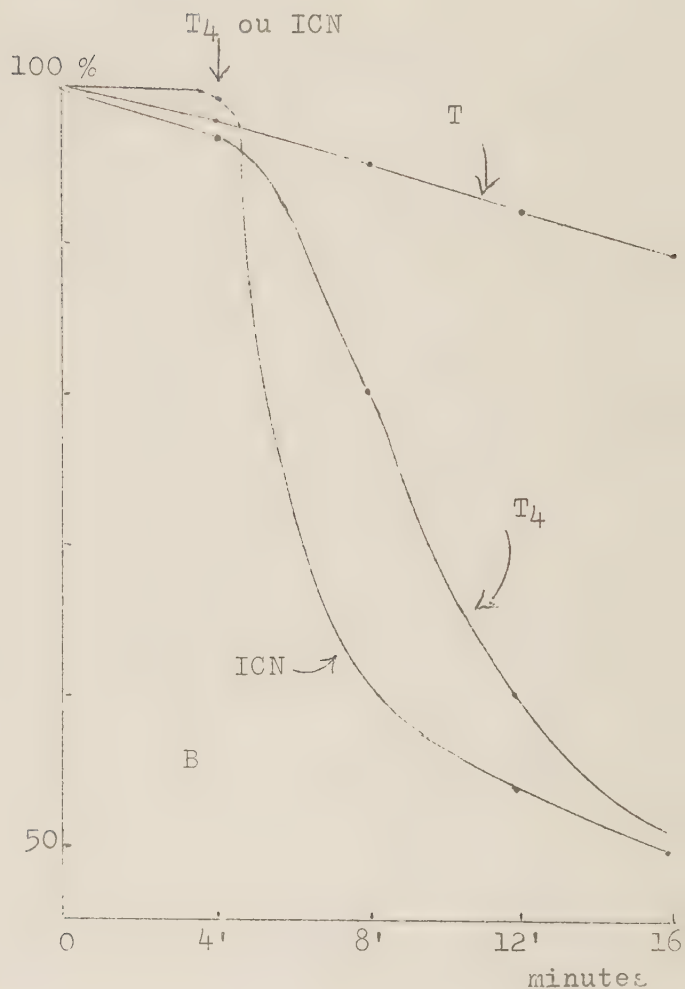
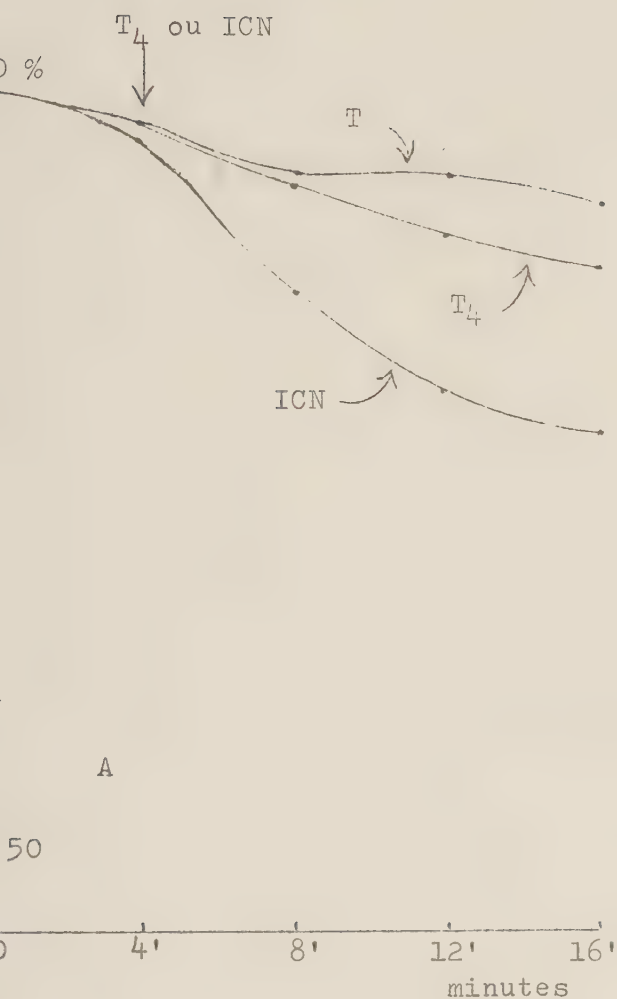
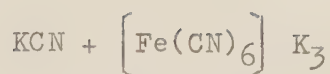


Figure 11 : Effets de T_4 et de ICN sur la morphologie mitochondriale en présence de $\text{KCN } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ avec ou sans $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3 10^{-3} \text{ M}$. Conditions expérimentales et représentation graphique analogue à celles de la figure 9.

A = Chaîne respiratoire inhibée par $\text{KCN } 2 \cdot 10^{-3}$ ajouté au temps 0.

B = Respiration rétablie par $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3 10^{-3} \text{ M}$ ajouté au temps 0.

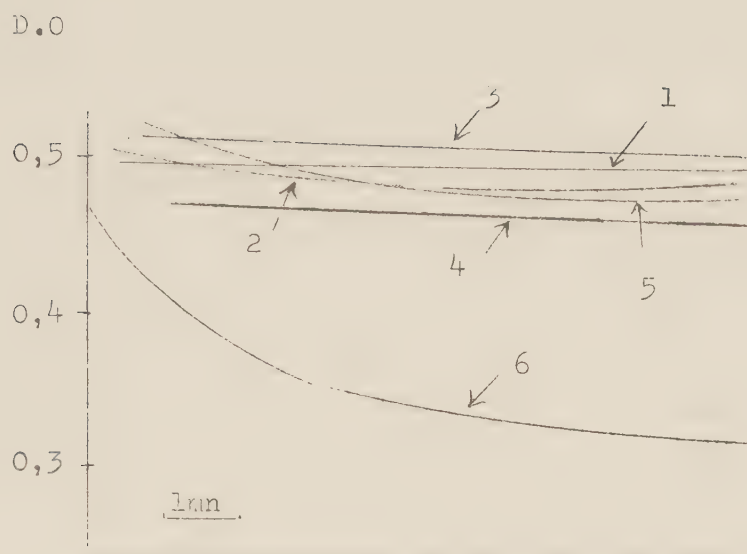


Figure 12 : Effets de T_4 et Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale en présence d'Antimycine A $0,3 \mu\text{g/ml}$, avec ou sans Acide Ascorbique + T.M.P.D.

Conditions analogues à celles de la figure 2.

Courbe 1 = Témoin

Courbe 2 = Ca^{2+} $2,6 \cdot 10^{-3}$ M

Courbe 3 = T_4 $8 \cdot 10^{-6}$ M

Courbe 4 = Acide Ascorbique $2,5 \cdot 10^{-3}$ M et T.M.P.D. $1,4 \cdot 10^{-4}$ M

Courbe 5 = Conditions de la courbe 4 plus T_4 $8 \cdot 10^{-6}$ M

Courbe 6 = Conditions de la courbe 4 plus Ca^{2+} $2,6 \cdot 10^{-3}$ M

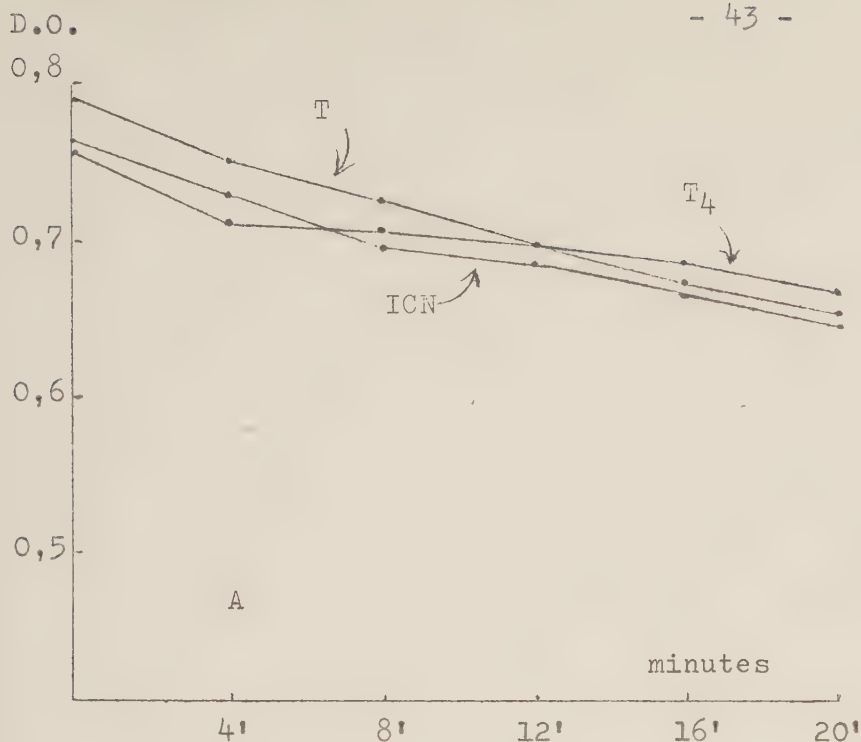
La figure 12 rend compte des résultats obtenus avec T_4 et Ca^{2+} dans ces conditions particulières. Au temps 0 les mitochondries sont ajoutées au tampon habituel additionné d'Antimycine A, et suivant les essais soit de T_4 , de Ca^{2+} ou d'acide ascorbique + TMPD. La densité optique de la suspension à 540 m μ est enregistrée en fonction du temps. Les courbes 1 et 4 ne révèlent aucune modification notable de la turbidité du milieu en l'absence de Ca^{2+} et de T_4 . De la même façon Ca^{2+} et T_4 n'exercent aucune activité mitochondriale, la respiration étant bloquée par l'Antimycine A (courbes 2 et 3). Les courbes 5 et 6 représentent les effets de T_4 et de Ca^{2+} , la respiration étant rétablie par l'acide ascorbique + TMPD. De l'examen de ces courbes il apparaît nettement que le produit iodé demeure sans effet sur la morphologie mitochondriale tandis que Ca^{2+} produit son effet habituel. Il s'ensuit que le transfert des électrons du Cyt. c à O_2 est suffisant pour assurer l'effet mitochondrial de Ca^{2+} alors que celui de T_4 ne peut avoir lieu dans ces conditions. Par contre, il apparaît que la région comprise entre les Cyt. b et c, sur laquelle s'articule la deuxième phosphorylation P_2 , est nécessaire à l'effet des produits iodés.

Il restait à vérifier cependant si cette région de la chaîne respiratoire et sa phosphorylation P_2 couplée pouvait assurer à elle seule l'action des hormones thyroïdiennes sur le gonflement mitochondrial. Il était donc nécessaire de faire un essai en isolant cette région de la chaîne respiratoire.

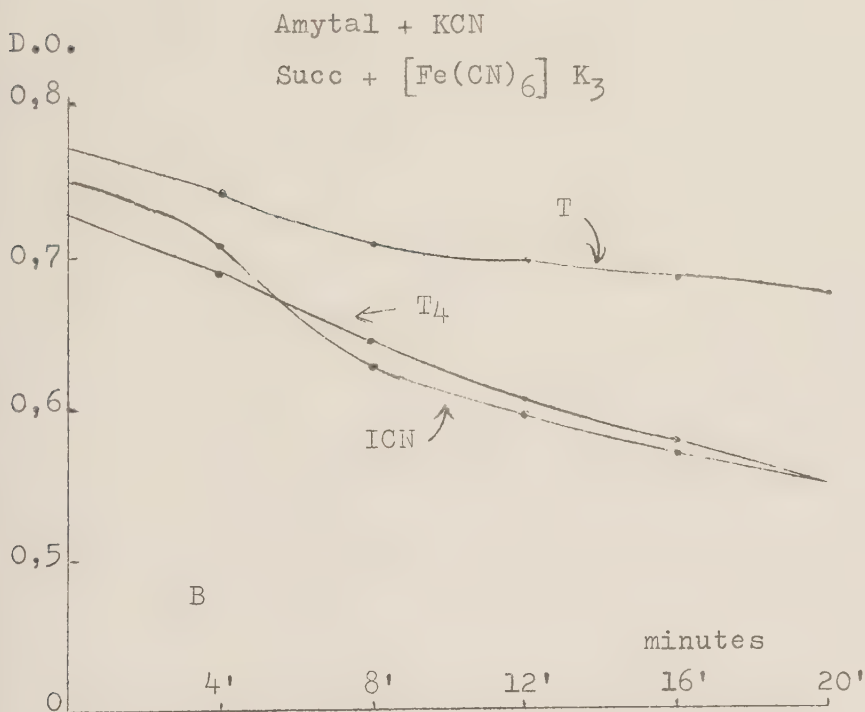
4 - Séparation de la région Cytochrome b - Cytochrome c -
Il est possible d'isoler la région comprenant les Cyt. b et c. Pour cela, à la suspension mitochondriale qui renferme de l'amy-tal ou de la roténone et du KCN, on ajoute du succinate qui in-

Amytal + KCN

- 43 -



A = Chaîne respiratoire
inhibée par Amytal et
KCN ajoutés au temps 0.

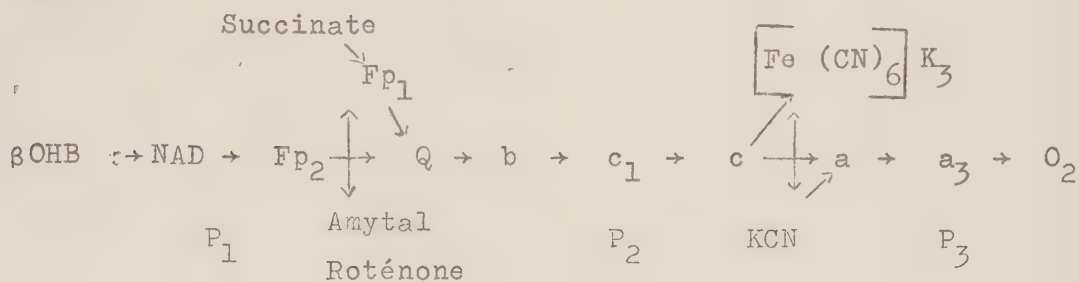


B = Respiration rétablie
par le succinate 10^{-3}M
et $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3$ 10^{-3}M
ajoutés au temps 0.

Figure 13 : Effets de T_4 et ICN sur la morphologie mitochondriale en présence d'Amytal $1,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$ et de KCN $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$, avec ou sans succinate et ferricyanure. Conditions expérimentales et représentation graphique analogues à celles de la figure 1.

tervient comme donateur d'électrons grâce à la voie de Fp_1 et du $[Fe(CN)_6]K_3$ qui accepte les électrons du Cytochrome c réduit. C'est ce que traduit le schéma D.

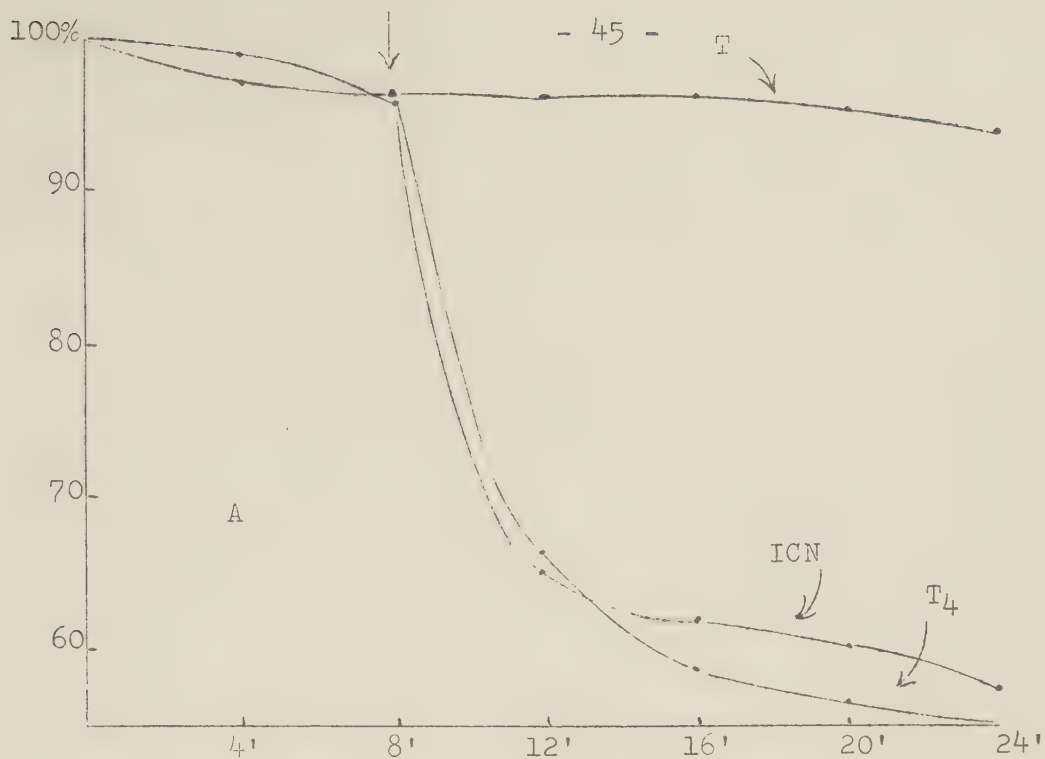
SCHEMA D



Dans ces conditions, seule la phosphorylation P_2 est couplée à l'oxydation du succinate.

La figure 13 rapporte les effets de T_4 et de ICN testés dans ces conditions. L'addition de ces deux produits à la suspension mitochondriale dont la respiration est inhibée par l'Amytal et le KCN n'entraîne aucun effet, les courbes obtenues se confondant avec celle du témoin (13 A). Par contre, lorsque le flux d'électrons est rétabli par la présence de succinate et de $[Fe(CN)_6]K_3$ dans le milieu, T_4 et ICN ajoutés à la 4e minute, produisent alors une nette diminution de la densité optique de la suspension mitochondriale (13 B). Ainsi dans des conditions limitant le transfert d'électrons à la région de la chaîne respiratoire comprise entre les Cytochromes b et c, les dérivés iodés produisent le gonflement des mitochondries.

Dès lors, une différence essentielle apparaît entre les mécanismes d'action des produits thyroïdiens et de Ca^{2+} . Alors que celui-ci provoque la fixation d'eau lorsque l'une au moins des trois phosphorylations est conservée, quelle que soit la



DNP 10^{-4} M

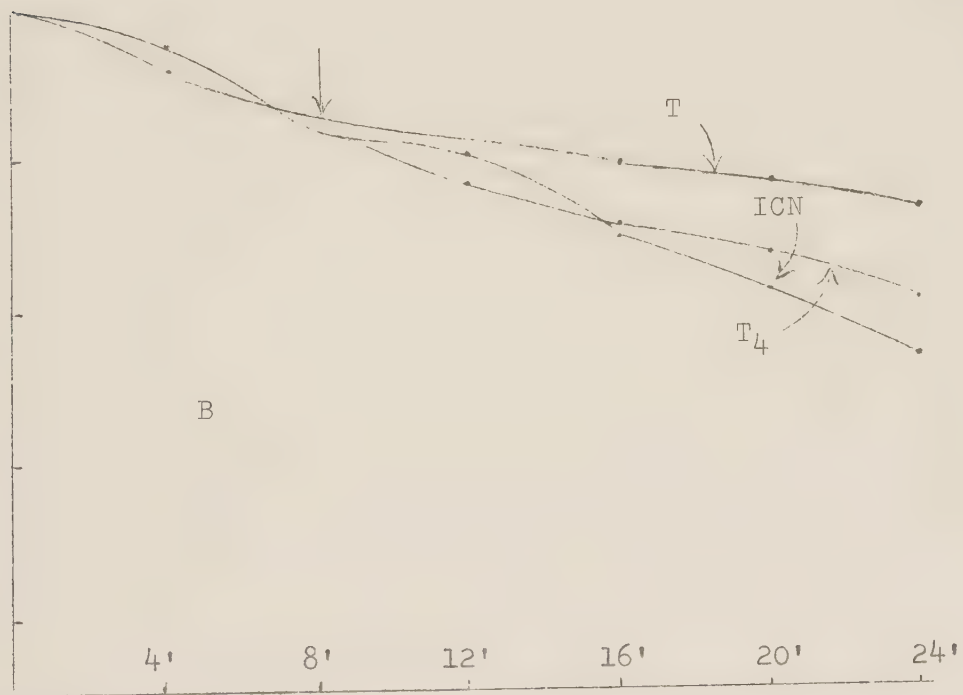


Figure 14 : Effets de T₄ et ICN sur la morphologie mitochondriale en l'absence (A) ou en présence de DNP 10^{-4} M ajouté au temps 0 (B). Conditions expérimentales analogues à celles de la figure 9, les produits iodés $5 \cdot 10^{-6}$ M étant ajoutés à la 8ème minute.

région où a lieu le couplage, l'action des dérivés iodés est liée préférentiellement à la région de la chaîne respiratoire comprise entre les Cytochromes b et c.

En outre, cette région sur laquelle s'articule la phosphorylation P_2 suffit à elle seule, pour assurer l'effet des hormones thyroïdiennes sur la morphologie mitochondriale.

III - Rôle des différentes étapes de la synthèse de l'ATP sur les effets mitochondriaux de T_4 et de Ca^{2+}

L'hypertrophie mitochondriale sous l'action des hormones thyroïdiennes ou de Ca^{2+} est liée à la respiration ainsi qu'aux phosphorylations couplées. Or nos expériences précédentes ont permis de montrer quelles sont les étapes du transfert des électrons indispensables aux effets de ces produits. On pouvait se demander également si les réactions du transfert d'énergie, conduisant à l'ATP, se montraient nécessaires ou bien si l'une d'entre elles seulement participait au phénomène. Nous avons donc entrepris d'étudier le gonflement particulier provoqué par T_4 , ICN, et Ca^{2+} en présence d'inhibiteurs spécifiques des phosphorylations, afin de dissocier les différents intermédiaires énergétiques de ces réactions. Nous avons fait appel pour cela au Dinitrophénol qui exerce son effet inhibiteur au niveau de la première étape de couplage, et à l'Oligomycine ainsi qu'à la Rutamycine qui s'opposent tous deux à l'organification du phosphate minéral.

1 - Effets de T_4 et ICN sur la morphologie mitochondriale en présence de DNP. - La figure 14 rend compte d'expériences effectuées en l'absence (14 A) et en présence de DNP dans le milieu (14 B), les produits iodés étant ajoutés à la huitième

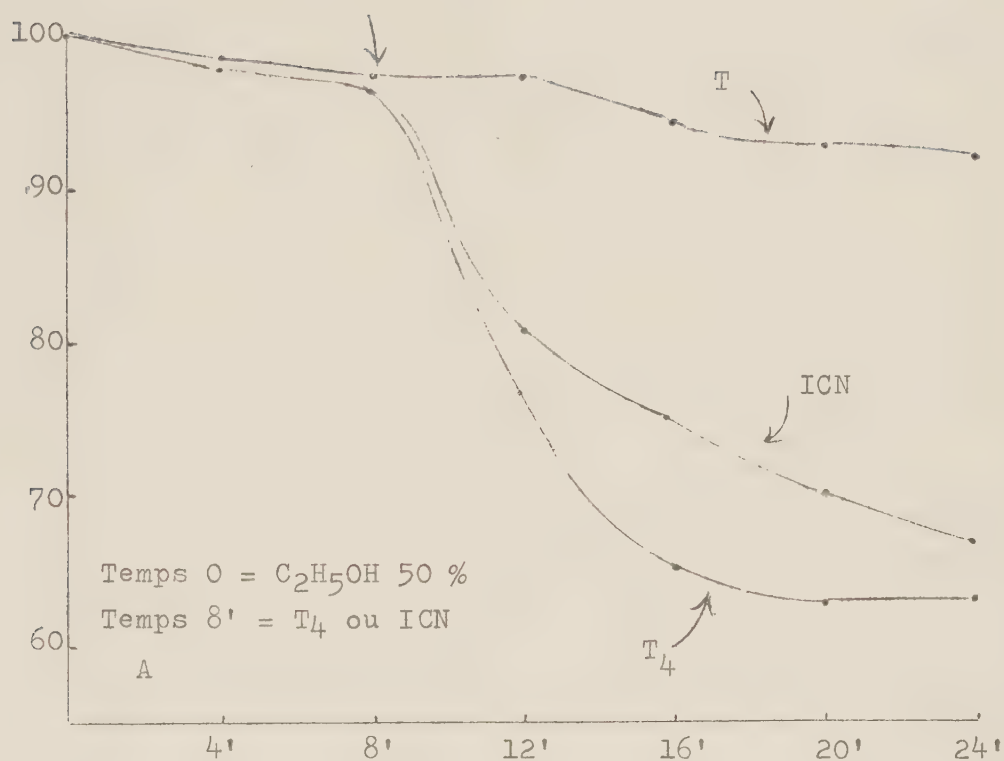


Figure 15 : Effets de T_4 et ICN sur la morphologie mitochondriale en présence de Rutamycine (C) ou d'Oligomycine (B). Conditions expérimentales analogues à celles de la figure 14.

A = Courbes témoins obtenues en l'absence des antibiotiques, ceux-ci étant remplacés par leur solvant (0,1 ml de C_2H_5OH 50 %).

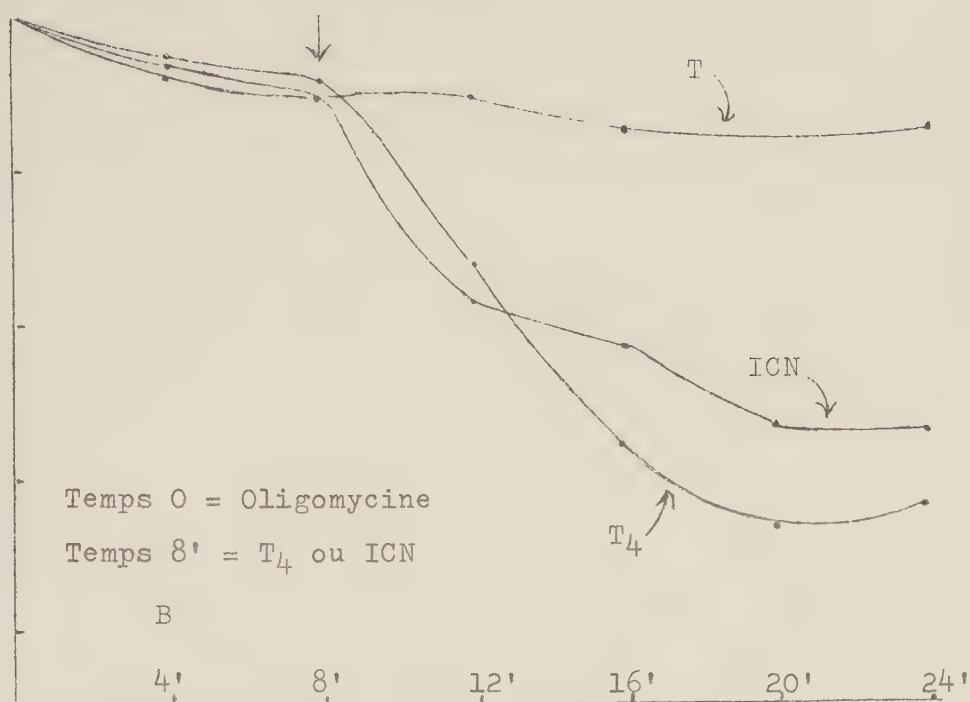


Figure 15 B = 2 $\mu\text{g/ml}$ d'Oligomycine en solution dans $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 50 % sont ajoutés au temps 0, sous un volume de 0,1 ml.

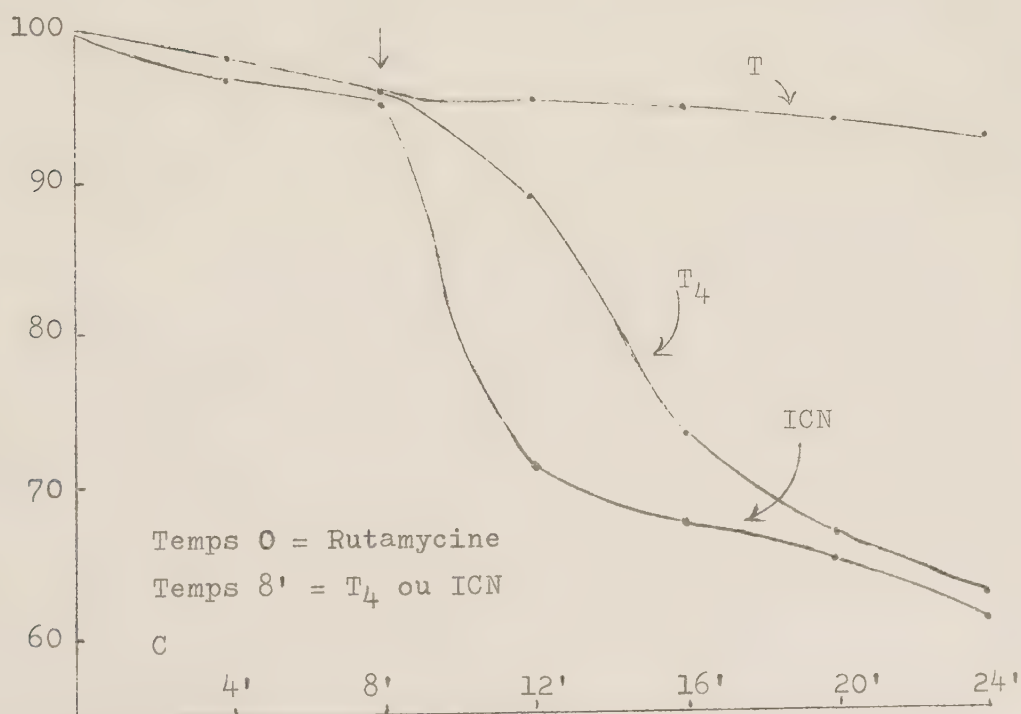


Figure 15 C = idem avec la Rutamycine.

minute. On constate qu'après suppression par le DNP des trois phosphorylations couplées, T_4 et ICN n'exercent plus d'activité mitochondriale. Il faut donc admettre qu'au moins une étape de la chaîne de transfert d'énergie, succédant à celle sur laquelle agit le DNP, est nécessaire aux effets des produits iodés. Nous avons donc répété ces expériences en remplaçant le DNP par l'Oligomycine et la Rutamycine qui inhibent cette chaîne de réaction à une étape ultérieure.

2 - Effets de T_4 et de ICN sur la morphologie mitochondriale en présence d'Oligomycine et de Rutamycine - Sur la figure 15 sont représentés les effets des produits iodés, ajoutés à la huitième minute, en l'absence d'antibiotique (15 A), et en présence d'Oligomycine (15 B), ou de Rutamycine (15 C). Il apparaît alors, que T_4 et ICN ne sont pas affectés par la présence dans le milieu de ces inhibiteurs de la synthèse de l'ATP. Il faut donc admettre que toutes les réactions conduisant à la phosphorylation de l'ADP, ne sont pas indispensables à la fixation d'eau par les mitochondries. Seules les réactions comprises entre les sites d'action du DNP et de l'Oligomycine ou de la Rutamycine doivent être assurées pour que le phénomène se manifeste.

On pouvait néanmoins se demander, quel serait le comportement des produits en présence d'Oligomycine ou de Rutamycine associée au DNP. Nous avons donc effectué des essais en ajoutant T_4 et ICN à la huitième minute, la suspension mitochondriale contenant déjà les antibiotiques ajoutés soit avant, soit après le découplant.

La figure 16 illustre les résultats obtenus dans de telles conditions avec l'Oligomycine. L'addition de T_4 et ICN

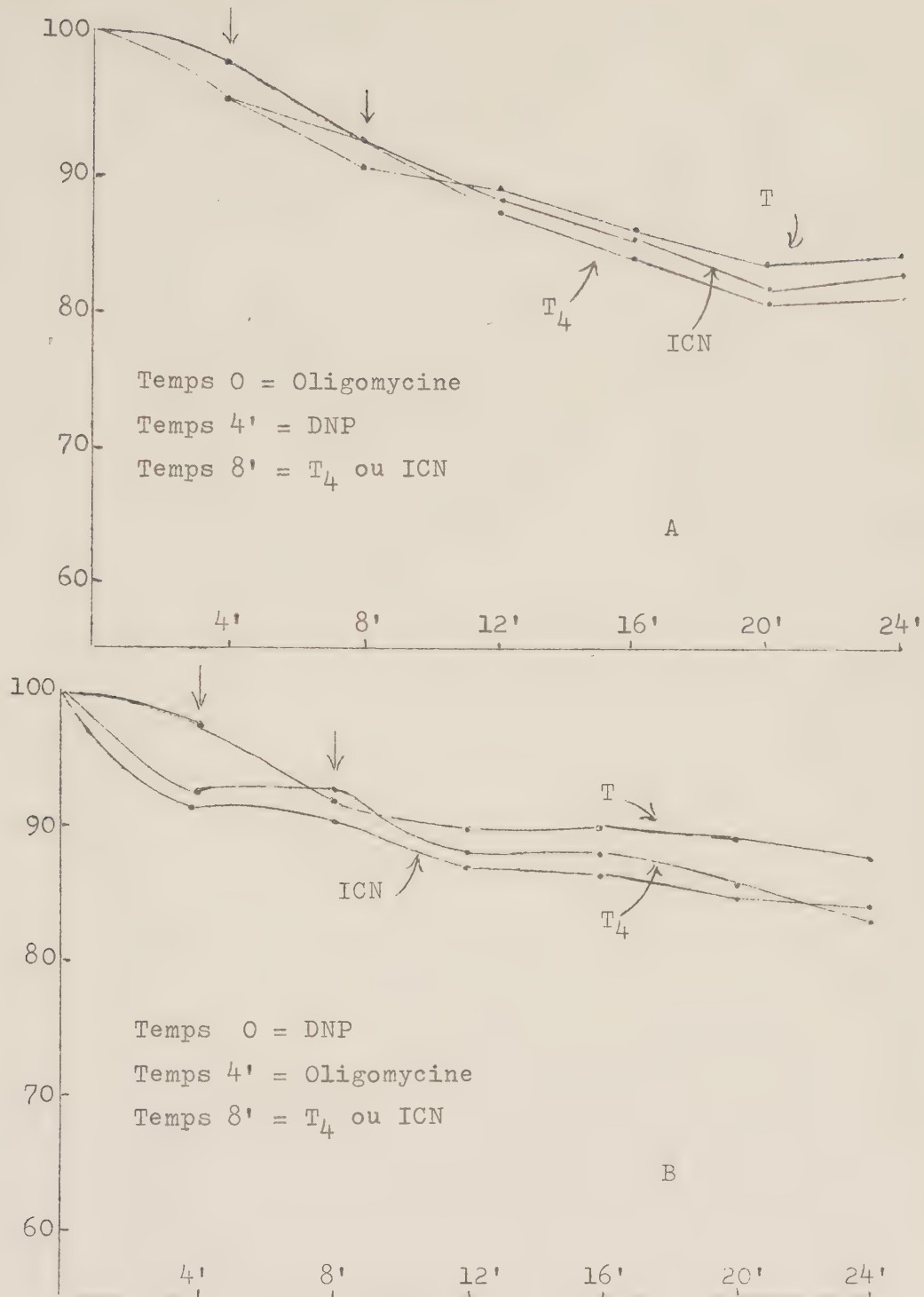


Figure 16 : Effets de l'oligomycine ($2\mu\text{g/ml}$) sur le gonflement des mitochondries en présence de T_4 ou de ICN, associé au DNP 10^{-4} M, celui-ci étant ajouté après (A) ou avant (B) l'antibiotique. Mêmes conditions que sur la figure 9.

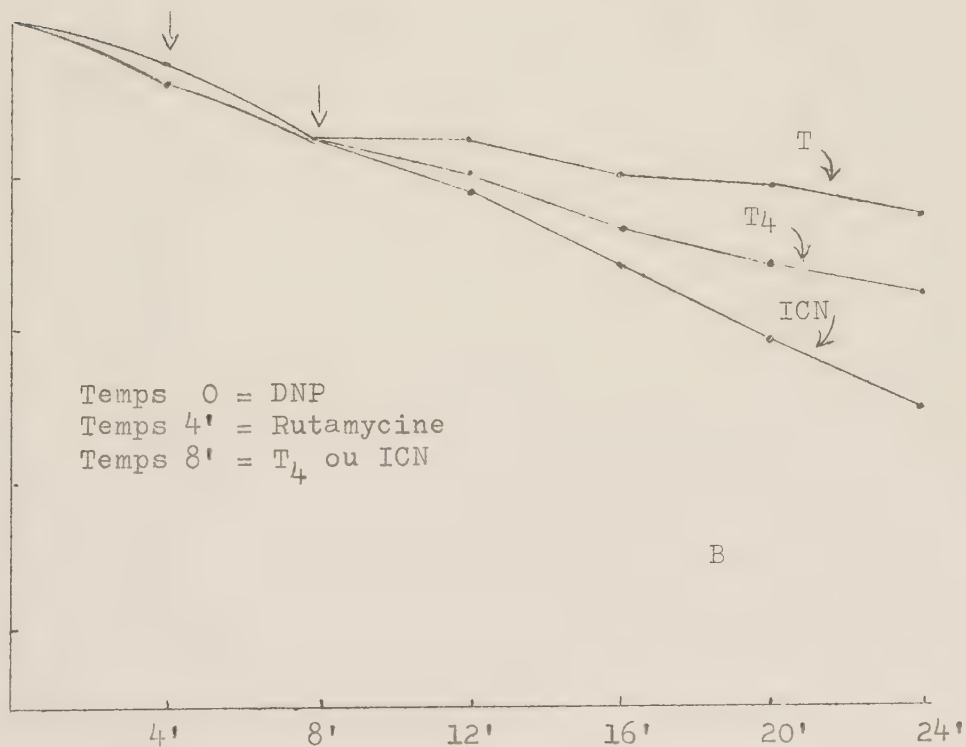
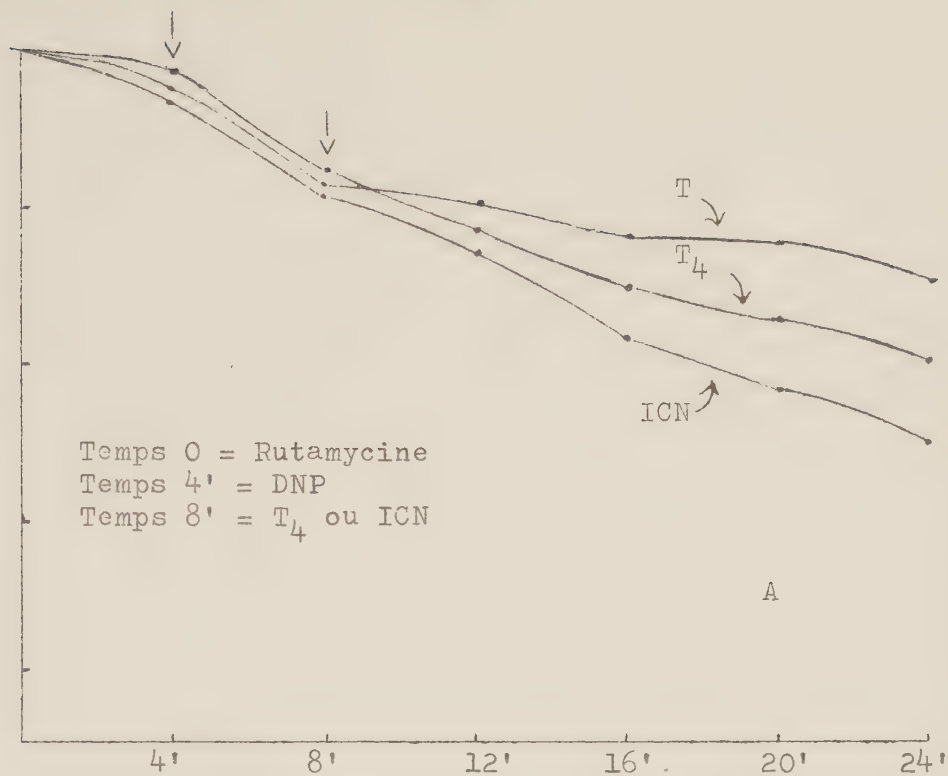


Figure 17 : Mêmes conditions que la figure 16 ; l'oligomycine étant remplacée par la rutamycine à la même concentration.

à la suspension mitochondriale n'entraîne aucune différence significative de la turbidité du milieu, que l'Oligomycine soit ajoutée avant (16 A) ou après le dérivé nitré (16 B). Un résultat analogue a été obtenu avec la Rutamycine comme le montre la figure 17. Ainsi en aucun cas, il n'a été possible de lever l'inhibition du DNP par ces antibiotiques, ce qui s'explique d'ailleurs par la localisation du site d'action de ces trois types de produits.

Enfin, nous avons également étudié l'effet de l'Oligomycine sur l'activité mitochondriale de T_4 et ICN, en isolant une partie des chaînes respiratoires ; notamment en supprimant la région sur laquelle s'articule la troisième phosphorylation P_3 qui se montre inutile à l'action de ces produits. Ces expériences ont donc été réalisées en ajoutant T_4 et ICN à la suspension mitochondriale renfermant déjà KCN et $[Fe(CN)_6]K_3$ et suivant les cas de l'Oligomycine ou non. La figure 18 rapporte les résultats obtenus en l'absence (18 A) et en présence d'Oligomycine (18 B). Aucune différence significative n'apparaît à l'examen de ces courbes ; l'Oligomycine n'entraîne donc aucune modification de l'activité des produits iodés sur la morphologie mitochondriale quelles que soient les conditions d'étude du phénomène.

3 - Effets des inhibiteurs de la synthèse de l'ATP sur le gonflement mitochondrial provoqué par Ca^{2+} . Les différentes expériences relatives au gonflement mitochondrial sous l'effet des produits iodés en présence de DNP, d'Oligomycine ou de Rutamycine ont été reprises en partie avec Ca^{2+} afin de déterminer si dans les deux cas le phénomène est lié au même intermédiaire énergétique. La figure 19 rend compte des effets de Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale en présence de DNP. On

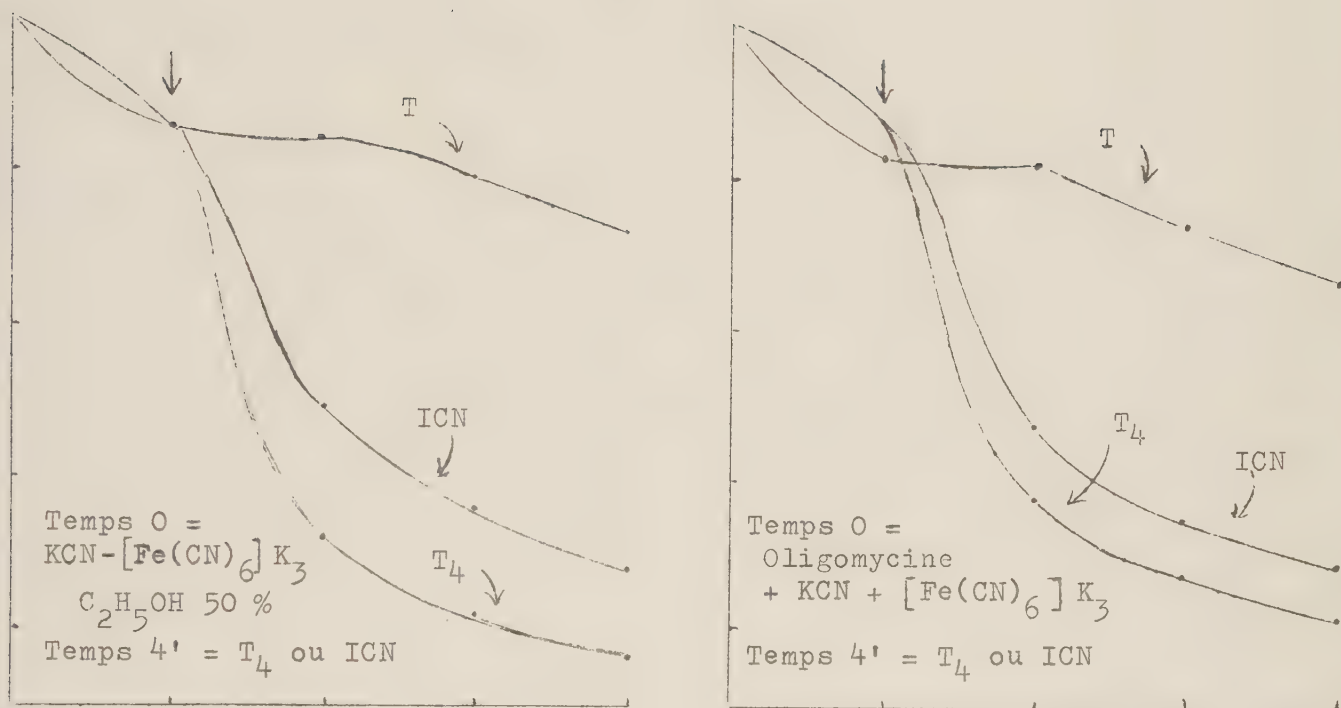


Figure 18 : Effets de T_4 ou de ICN sur la morphologie mitochondriale après inhibition de la respiration par $\text{KCN } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ et restauration du flux d'électrons par $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3 10^{-3} \text{ M}$ en l'absence (A) ou en présence (B) d'oligomycine $2 \mu\text{g/ml}$.

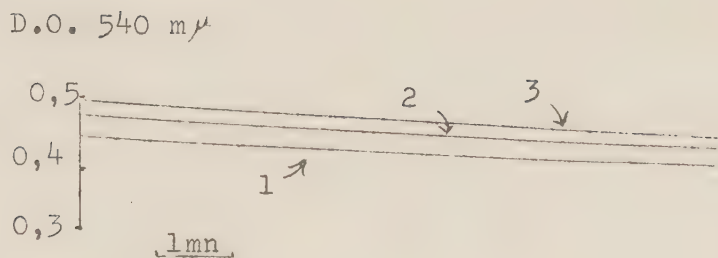


Figure 19 : Effet de Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale en présence de DNP. Conditions expérimentales analogues à celles de la figure 2.
 Tampon Tris 0,02 M - ClK 0,125 M pH 7,4 - Roténone 10^{-7} M - DNP 10^{-4} M
 Addition au Temps 0 =
 Courbe 1 = succinate de Na $4,6 \cdot 10^{-5}$ M
 Courbe 2 = succinate de Na $4,6 \cdot 10^{-5}$ M + Ca^{2+} $2,6 \cdot 10^{-3}$ M
 Courbe 3 = Ca^{2+} $2,6 \cdot 10^{-3}$ M

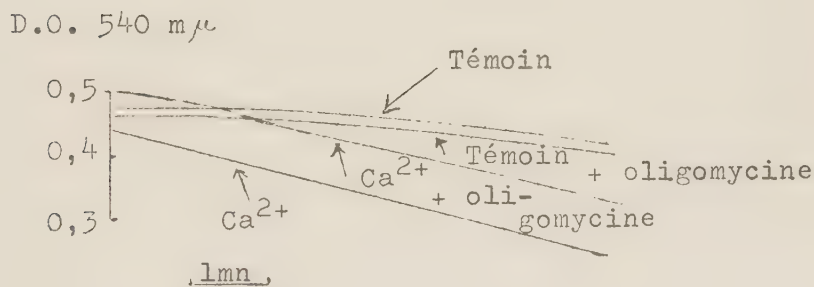


Figure 20 : Effets de Ca^{2+} ($2,6 \cdot 10^{-3}$ M) sur la morphologie mitochondriale en présence de Roténone 10^{-7} M et succinate $4,6 \cdot 10^{-5}$ M avec ou sans oligomycine $2 \mu\text{g/ml}$.

constate alors que la présence du produit nitré empêche tout gonflement particulière lorsque l'on ajoute Ca^{2+} au milieu.

La figure 20 reproduit les résultats obtenus au cours d'une de ces expériences de gonflement mitochondrial sous l'effet de Ca^{2+} , en association avec l'oligomycine. En l'absence de Ca^{2+} (courbe 1), comme en présence d'oligomycine (courbe 2), aucune modification de la turbidité de la suspension ne se manifeste. Par contre l'addition de Ca^{2+} provoque une diminution régulière de la densité optique, que le milieu soit supplémenté ou non en Oligomycine (courbes 3 et 4).

Des résultats analogues ont été obtenus en remplaçant l'Oligomycine par la Rutamycine comme on peut le voir sur la figure 21. Au cours de cette expérience, les effets de cet inhibiteur des phosphorylations a en outre été étudié sur le gonflement mitochondrial produit par T_4 et TA_3 . Aucune différence significative ne peut être relevée entre les figures 21 A et 21 B, reproduisant l'effet de ces produits en présence et en l'absence de Rutamycine.

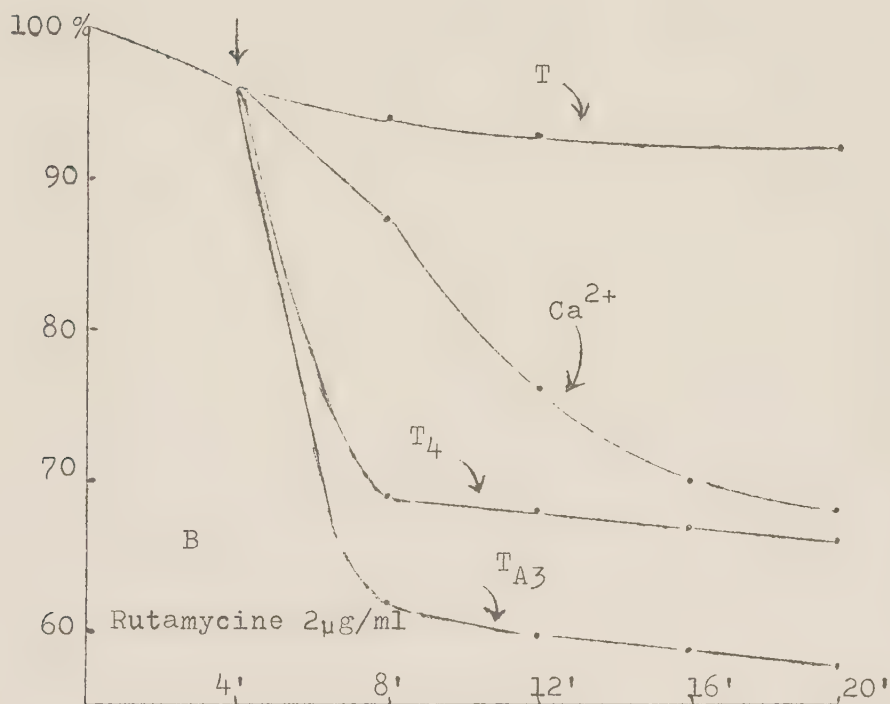
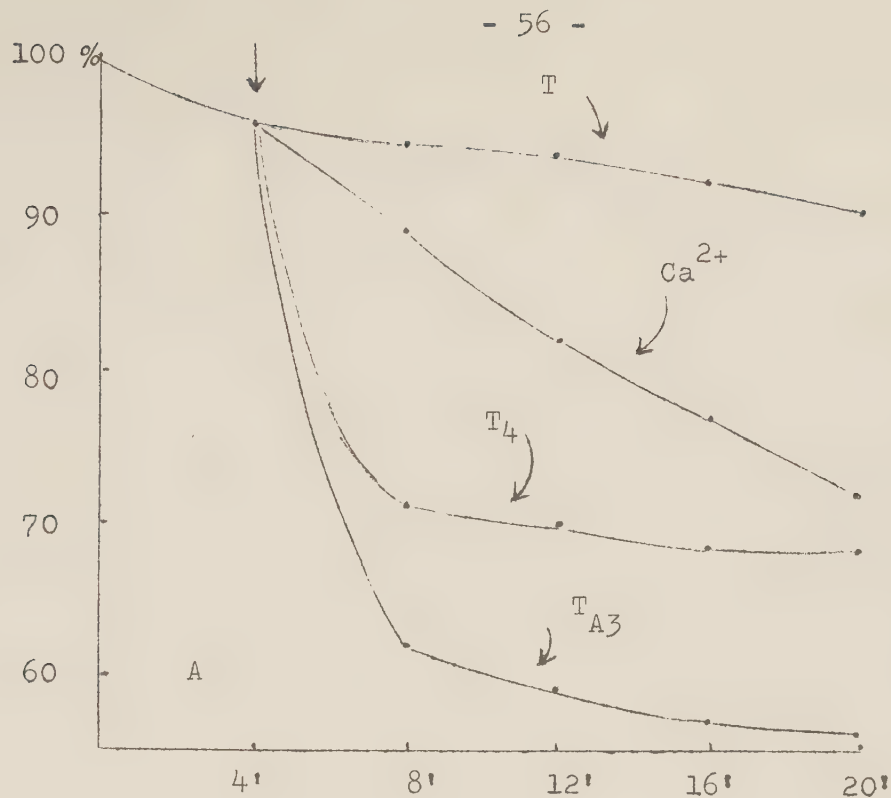


Figure 21 : Effets de T_4 (10^{-5} M) - Ca^{2+} ($2,6 \cdot 10^{-3}$ M) - T_{A3} (10^{-5} M), sur la morphologie mitochondriale en l'absence (A) et en présence (B) de Rutamycine $2 \mu\text{g/ml}$.

DISCUSSION

-:-

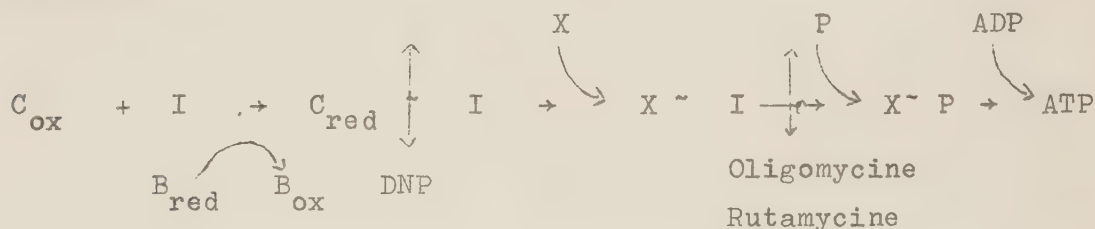
Les effets de T_4 et de Ca^{2+} sur la morphologie mitochondriale présentent des analogies et des différences. L'un et l'autre ajoutés à des mitochondries placées dans un tampon isotonique à pH 7,4, provoquent le gonflement de ces particules. Cependant si les deux produits exigent pour agir que la respiration et le couplage des phosphorylations soient assurés, l'activité de T_4 est plus de 300 fois supérieure à celle de Ca^{2+} . Par ailleurs l'action de T_4 est liée préférentiellement à la deuxième phosphorylation P_2 qui se montre nécessaire et suffisante à l'effet de l'hormone thyroïdienne et des autres donateurs d'ions I^+ étudiés. Au contraire, les effets de Ca^{2+} étudiés comparativement à ceux de T_4 , montrent que ce cation provoque la fixation d'eau à condition que l'une au moins des trois phosphorylations soit conservée, quelle que soit la région où a lieu le couplage.

Cependant, en considérant les résultats obtenus à l'aide des différents inhibiteurs de la synthèse de l'ATP, il semble que Ca^{2+} et T_4 interviennent sur le même intermédiaire énergétique puisque l'action de ces deux produits est supprimée par le DNP, alors qu'elle persiste en présence d'Oligomycine et de Rutamycine.

Parmi les différentes hypothèses qui ont été formulées pour expliquer la formation de l'ATP au cours des oxydations phosphorylantes, si l'on excepte celle de MITCHELL (120 à 124)

basée sur l'existence d'un gradient de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale et sur la conservation de l'énergie sous forme de dérivé phosphorylé, toutes admettent l'existence d'étapes de couplage précédant l'intervention du phosphate minéral (30). LEHNINGER et WADKIN (94, 95) n'en reconnaissent qu'une seule, tandis que CHANCE et WILLIAMS (30) en envisagent deux. Chacune de ces hypothèses est étayée sur des faits expérimentaux mais celle de CHANCE semble maintenant admise par la majorité des auteurs et permet de localiser le point d'action éventuel de Ca^{2+} et de T_4 . La conception de CHANCE est schématisée sur le schéma E.

SCHEMA E



Dans ces réactions, B et C représentent deux transporteurs d'électrons contigus de la chaîne respiratoire, I serait un intermédiaire structural se combinant à C_{red} au cours de la première étape de couplage pour former le composé énergétique $\text{C} \sim \text{I}$. Un autre intermédiaire X interviendrait lors du couplage conduisant au composé $\text{X} \sim \text{I}$. Ces deux stades comportent donc la conservation de l'énergie, ce n'est qu'ensuite que le phosphate minéral interviendrait pour former l'intermédiaire à haute énergie $\text{X} \sim \text{P}$ précédant la phosphorylation de l'ADP.

On considère que le DNP exerce son activité découplante en provoquant l'hydrolyse de $C \sim I$, vraisemblablement après formation temporaire d'un complexe très instable entre $C \sim I$ et DNP. Il faut donc admettre pour expliquer l'effet inhibiteur de ce corps sur les manifestations mitochondriales de T_4 et de Ca^{2+} , que l'action de ces deux produits se localise sur une étape ultérieure de la synthèse de l'ATP.

Il avait été précédemment admis que la tension des crêtes mitochondriales dépendait d'un dérivé phosphorylé et que PO_4^{3-} (67, 96) ou les hormones thyroïdiennes (118) influençaient la formation de cet intermédiaire et on considérerait que l'Oligomycine intervenait sur la réaction d'échange ADP - ATP (83). Or cet antibiotique tout comme la Rutamycine empêche la formation du composé $X \sim P$; il faut donc admettre que l'action de Ca^{2+} et des produits iodés, qui n'est pas affectée par l'Oligomycine et la Rutamycine mais qui est empêchée par DNP, doit se manifester avant l'organification du phosphate mais après $C \sim I$, c'est-à-dire sur la deuxième étape de couplage conduisant à l'intermédiaire $X \sim I$.

Il semble donc que la différence essentielle entre le comportement de Ca^{2+} et des hormones thyroïdiennes serait due simplement au fait que le premier agirait sur les trois dérivés formés au cours de la chaîne de transport des électrons, tandis que les iodothyronines n'interviendraient que sur le deuxième intermédiaire, articulé sur la région respiratoire délimitée par les cytochromes b, c_1 et c.

DEUXIEME PARTIE

--

ACTION DES PRODUITS THYROIDIENS SUR LA CAPTA- TION MITOCHONDRIALE DE Ca^{++}

--

INTRODUCTION

Les mitochondries isolées à partir de différents tissus tels le foie, les reins, le coeur et placées dans un milieu assurant une respiration élevée, sont capables de retenir divers cations, tels que, K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} et même de les fixer en grandes quantités lorsqu'ils sont ajoutés au milieu (13, 14, 15, 16, 22, 23, 24, 40, 41, 46, 47, 156, 157, 159).

Il est rapidement apparu que ces phénomènes actifs sont en relation étroite avec les mécanismes de phosphorylations oxydatives. Dès lors, des travaux ont été consacrés à l'étude de ces transports ioniques dans les mitochondries, ils ont permis d'ailleurs d'obtenir des données nouvelles sur les réactions d'oxydation phosphorylantes. Parmi ces cations Ca^{++} a été sans doute celui qui a fait l'objet du plus grand nombre de recherches, d'une part du fait de son importance physiologique, et d'autre part à cause des quantités considérables fixées par les mitochondries.

Ce sont essentiellement les travaux de VASINGTON et MURPHY (191, 192, 193), BRIERLEY, MURER et BACHMANN (13, 14, 15), ROSSI et LEHNINGER (97, 156, 157) qui ont permis de définir les meilleures conditions expérimentales permettant une captation maximum de Ca^{++} par les mitochondries et de préciser

ainsi les relations stéchiométriques entre l'accumulation ionique et le transfert électronique.

En effet, la captation mitochondriale de Ca^{++} est liée à l'oxydation d'un substrat hydrogéné tel que le β -hydroxybutyrate, le succinate, le glutamate, le malate ... Ce mécanisme se trouve complètement inhibé lorsque la respiration est bloquée par un de ses inhibiteurs, qu'il s'agisse de Roténone, d'Amytal, d'Antimycine A ou de Cyanure ou encore lorsque l'incubation est effectuée à 0°C , température à laquelle le transport des électrons est pratiquement supprimé. En outre, la présence dans le milieu d'incubation de phosphate inorganique, de Mg^{++} et d'ATP est nécessaire à une captation massive de calcium par les mitochondries, laquelle est encore stimulée par Na^+ et K^+ . Néanmoins, les particules sont capables de capter Ca^{++} en l'absence de Phosphate, de Mg^{++} et d'ATP (60), mais le phénomène est alors limité et demeure toujours au moins dix fois plus faible que celui qui se manifeste en milieu phosphaté. L'ATP ne peut pas être remplacé par d'autres nucléotides tels que l'AMP ou l'ADP, et son effet activateur est optimum pour de faibles concentrations, 2 à $3 \cdot 10^{-3}$ M, lesquelles n'apportent qu'une quantité minime d'énergie, incapable d'assurer à elle seule la captation mitochondriale massive de Ca^{++} . Le rôle de l'ATP reste assez obscur mais on peut supposer qu'il protège les membranes particulières contre les effets néfastes que le phosphate exerce, aux concentrations utilisées, sur leurs structures (158). Les mitochondries placées dans un tel système captent alors activement Ca^{++} , et ce jusqu'à ce que celui-ci ait disparu du milieu d'incubation. Si toutefois Ca^{++} se trouve en excès, la fixation s'arrête lorsqu'elles ont fixé environ 2,5 μmole de Ca^{++} par mg de protéines. Par conséquent, comme les mitochondries fraîchement préparées renferment environ 5 $\text{m} \mu\text{moles}$ de Ca^{++} (98), on peut admettre qu'elles attei-

gnent un état de saturation lorsqu'elles ont capté 500 fois la valeur de leur Ca^{++} endogène.

La captation massive de Ca^{++} par les mitochondries, intimement liée au passage des électrons le long des chaînes respiratoires, dépend des réactions de couplage des phosphorylations aux oxydations. En effet, la présence dans le milieu d'incubation de 2-4-dinitrophénol, découplant les phosphorylations des oxydations, inhibe totalement le transport intramitochondrial du calcium (192). Par contre l'Oligomycine, inhibant les phosphorylations au niveau de l'intégration du phosphate, n'exerce aucun effet sur la captation de Ca^{++} liée à la respiration (46, 157).

Par ailleurs, ROSSI et LEHNINGER (157) ont montré que la captation de Ca^{++} pouvait avoir lieu en l'absence de respiration, à condition que le milieu soit supplémenté en ATP à forte concentration (environ 15.10^{-3} M). Dans ces conditions, la captation de Ca^{++} par les mitochondries, également activée par la présence de Mg^{++} dans le milieu, est liée à l'hydrolyse de l'ATP. Cette voie ATPasique se manifestant en dehors de la voie respiratoire, possède la particularité que les inhibiteurs du transfert des électrons sont sans effet sur la fixation de Ca^{++} par les mitochondries, alors que l'Oligomycine inhibe totalement le phénomène. Quant au 2-4-dinitrophénol, il présente toujours un effet inhibiteur, que la captation soit sous la dépendance de l'énergie respiratoire ou de l'ATP (157).

Tous ces faits mettent en évidence le rôle joué par les réactions de couplage des phosphorylations aux oxydations, dans le mécanisme d'accumulation de Ca^{++} par les mitochondries. Or

l'étude des effets des produits iodés sur la morphologie mitochondriale a également permis de mettre en évidence l'importance de ces étapes sur l'activité des hormones thyroïdiennes. C'est pourquoi nous avons entrepris des recherches sur un effet éventuel de celles-ci sur les mécanismes de fixation du cation par les mitochondries.

Nous avons étudié ces effets aussi bien sur la fixation par la voie respiratoire en milieu phosphaté ou non, que par celle dépendant de l'hydrolyse de l'ATP.

Enfin, nous nous sommes surtout attachés à rechercher si la seconde phosphorylation, qui se montre indispensable à l'effet des produits thyroïdiens sur la morphologie mitochondriale, présentait la même importance sur le transport des ions.

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons étudié la captation de Ca^{++} dans diverses conditions expérimentales, où l'on a fait varier la composition du milieu, la température et la durée d'incubation ; les indications particulières étant présentées à propos de chacun des essais effectués.

D'une façon générale, les incubations ont été réalisées dans des fioles de verre de 25 ml fixées à un thermostat et soumises à une agitation régulière dont l'amplitude a été réglée à 3 cm et la fréquence à 90 par minute.

Les mitochondries correspondant à 4 ou 5 mg de protéines sont ajoutées à 3 ml d'une solution tamponnée en présence

de Ca^{++} marqué par 0,2 μC de ^{45}Ca . Après un temps déterminé, l'incubation est arrêtée en prélevant une partie aliquote du mélange, 2 ml généralement, que l'on place dans un tube à centrifuger maintenu dans la glace pilée. On centrifuge immédiatement pendant 4 mn à 22.000 g, à une température voisine de 0°C. Le calcium est énergiquement fixé par les mitochondries, aussi nous avons constaté qu'en opérant dans ces conditions, aucun échange n'a lieu entre le culot mitochondrial et le milieu surnageant.

La détermination de la quantité de Ca^{++} fixé par les mitochondries s'effectue ensuite par mesure de la radioactivité. Celle-ci est réalisée soit sur le culot mitochondrial, soit sur le surnageant, le Ca^{++} fixé correspondant alors à la diminution de la radioactivité.

Dans le premier cas, après élimination du surnageant, le culot de mitochondries est mis en suspension dans 2 ml de saccharose 0,25 M à 0°C. Après une nouvelle centrifugation à 22.000 g pendant 4 minutes, on extrait Ca^{++} du culot par 2 ml d'acide trichloracétique à 5 %.

^{45}Ca étant un émetteur de radiations β de faible énergie (0,255 MeV) il est nécessaire, pour mesurer son activité, de recourir à des méthodes particulièrement sensibles. Nous avons généralement utilisé la scintillation en phase liquide, à l'aide de l'appareil Tricarb. La mesure de radioactivité est effectuée par cette méthode sur 0,2 ml de l'extrait trichloracétique centrifugé, mis en solution à l'aide de 3 ml d'éthanol absolu dans 15 ml d'une solution ayant la composition suivante : 2-5-diphényloxazole 5 g, 4-méthyl-5-phényloxalil-benzène 0,30 g, toluène 1000 ml.

Au cours de certaines expériences, nous avons employé cependant un compteur Geiger-Muller muni d'une fenêtre suffisamment mince (inférieure à 1 mg/cm²). Les mesures de la radioactivité par cette méthode ont été effectuées sur une partie aliquote de l'extrait trichloracétique soigneusement étalée sur une coupelle et desséchée.

Dans le deuxième cas, une partie aliquote du surnageant est déprotéinisée par une quantité égale d'acide trichloracétique à 10 %. Après centrifugation, la radioactivité est mesurée par scintillation liquide sur 0,2 ml de surnageant dans les mêmes conditions que précédemment. Les mesures peuvent être également effectuées à l'aide du compteur de Geiger-Muller sur une partie aliquote du surnageant non déprotéinisé, en respectant les précautions particulières citées plus haut. Par différence entre la radioactivité d'un témoin sans mitochondrie et celle des essais, on détermine la quantité de Ca⁺⁺ fixée par les particules.

Suivant l'expérience envisagée, nous avons utilisé l'une ou l'autre de ces techniques, lesquelles d'ailleurs conduisent à des résultats voisins (192).

II - INFLUENCE DE T₃, TA₃ , ET ICN SUR LA CAPTATION DE Ca⁺⁺ DANS LES CONDITIONS OPTIMA DE FIXATION

Nous avons entrepris des recherches afin de déterminer si les produits iodés exerçaient une influence sur la captation mitochondriale de Ca⁺⁺. Les essais ont été effectués dans des conditions permettant une fixation élevée en Ca⁺⁺. Pour cela, le milieu saturé d'oxygène doit renfermer un substrat hydrogéné, en particulier du succinate qui donne le meilleur ren-

dement, du phosphate, du Mg^{++} , et de l'ATP à des concentrations déterminées. Dans ces conditions, les mitochondries atteignent la saturation lorsqu'elles ont fixé environ 1,5 μ mole de Ca^{++} ; en opérant à 30°C, ce niveau est atteint en 15 à 20 minutes (192).

1 - Influence de T_3 et TA_3

Nous avons d'abord étudié, d'une part les effets de T_3 et TA_3 sur la captation de Ca^{++} dans les conditions où sa fixation est maximum. Nous n'avons pas pu par contre effectuer des essais avec T_4 à cause de la faible solubilité de cette hormone aux pH voisins de la neutralité, surtout en présence de Ca^{++} et Mg^{++} .

Les mitochondries, correspondant à 4 ou 5 mg de protéines, sont ajoutées à 3 ml d'un milieu saturé d'oxygène ayant la composition suivante : PO_4HNa_2 4.10^{-3} M, Tris-ClH 5.10^{-3} M, pH 7, NaCl $1,3.10^{-1}$ M, $MgCl_2$ 10^{-2} M, succinate de Na $6,7.10^{-3}$ M, $CaCl_2$ marqué par ^{45}Ca $2,5.10^{-3}$ M, saccharose $1,66.10^{-2}$ M, ATP 3.10^{-3} M et T_3 ou TA_3 à des concentrations variables allant de 10^{-5} à 5.10^{-5} M.

L'incubation est poursuivie pendant 20 minutes à 30°C et la radioactivité des mitochondries est mesurée suivant l'une des techniques indiquées précédemment.

La figure 22 rend compte des résultats obtenus au cours d'une de ces expériences. Les courbes ont été établies en portant en ordonnées les quantités de Ca^{++} fixées, exprimées en μ Atomes et rapportées au mg de protéines mitochondriales, et en abscisses les concentrations de T_3 et TA_3 utilisées. Des résultats de ces expériences, il apparaît que les deux composés étudiés produisent l'un et l'autre une inhibition de

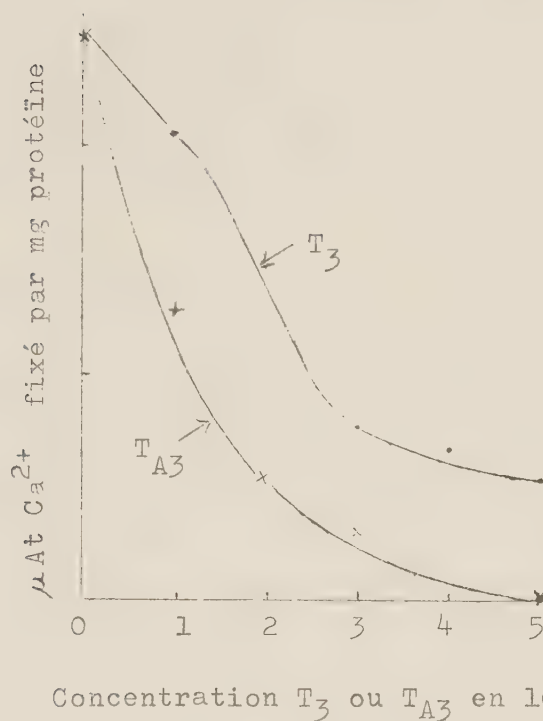


Figure 22 : Effet de concentrations croissantes de T_3 ou $\text{T}_{\text{A}3}$ sur la fixation de Ca^{++} par les mitochondries. Les conditions opératoires sont définies dans le texte.

Effet sur Ca^{2+}	Té- moin	$\text{T}_{\text{A}3}$ 5.10^{-5} M	ICN 5.10^{-5} M	Té- moin	$\text{T}_{\text{A}3}$ 5.10^{-5} M	IK 5.10^{-5} M
Fixation en μAt mg protéine	1,21	0,16	0,14	1,07	0,12	0,96
% inhibition	0	86	88	0	88	10

Tableau 1 : Fixation du Ca^{++} par les mitochondries en présence de $\text{T}_{\text{A}3}$ - ICN - IK.

la captation mitochondriale de Ca^{++} , laquelle est proportionnelle à leur concentration. Cependant, c'est TA_3 qui manifeste la plus forte activité puisqu'il provoque une inhibition de 50 % pour une concentration de 10^{-5} M, alors qu'il est nécessaire d'utiliser une concentration sensiblement double de T_3 pour atteindre le même résultat. A 4.10^{-5} M, TA_3 empêche complètement la fixation de Ca^{++} .

2 - Influence de ICN

Nous avons également recherché si ICN, dont les effets sont identiques à ceux des hormones thyroïdiennes sur le gonflement des mitochondries (117, 118, 119, 139, 140, 151), exerçait un effet inhibiteur sur la fixation mitochondriale de Ca^{++} .

Des essais ont été réalisés en reprenant les conditions opératoires précédentes, avec TA_3 et ICN, tous deux à la concentration de 5.10^{-5} M. Cependant, afin d'éliminer une inhibition éventuelle due à I^- se formant à partir d'ICN, un essai comparatif a été conduit en utilisant IK à la même concentration.

Les résultats obtenus au cours d'une de ces expériences ont été rassemblés dans le tableau I. Il apparaît que ICN, à la concentration de 5.10^{-5} M, produit une inhibition de la captation particulière quantitativement comparable à celle produite par la même concentration de TA_3 . En outre, nous pouvons éliminer l'éventualité d'un effet inhibiteur de I^- , puisque IK testé à la même concentration n'entraîne aucune modification significative de la captation de Ca^{++} . L'empêchement de la fixation de Ca^{++} en présence de ICN ne peut pas non plus être rapporté à CN^- apparu. En effet, nous avons vérifié qu'à la concentration de 5.10^{-5} M, KCN est sans action, l'arrêt du

transfert des électrons n'ayant lieu que pour des concentrations comprises entre 10^{-2} et 10^{-3} M.

Il ressort donc de ces premiers résultats, que les produits iodés s'opposent à la pénétration de Ca^{++} dans les mitochondries, alors qu'ils présentaient de nombreux points communs quant à leurs effets sur la morphologie mitochondriale.

III - ROLE DES DIVERSES PHOSPHORYLATIONS COUPLEES AU TRANSFERT DES ELECTRONS, SUR LES EFFETS DES PRODUITS THYROIDIENS SUR LA CAPTATION DE Ca^{++} PAR LES MITOCHONDRIES

La captation de Ca^{++} par les mitochondries est liée aux mécanismes des phosphorylations associées à l'oxydation d'un substrat hydrogéné quel qu'il soit, ce qui implique que chacune des trois phosphorylations couplées aux chaînes respiratoires peut assurer le phénomène. En effet, l'accumulation de Ca^{++} par les mitochondries s'effectue activement, que le substrat soit le β -hydroxybutyrate, le succinate, ou l'association ascorbate-TMPD (157). Au contraire, les recherches sur les effets des produits thyroïdiens sur la morphologie mitochondriale ont permis de montrer que la seconde phosphorylation articulée sur le cytochrome b apparaît comme indispensable à l'action des hormones.

Nous avons poursuivi l'étude des effets des produits iodés sur la captation de Ca^{++} , en rapportant le phénomène à certaines phosphorylations que nous avons isolées à l'aide d'inhibiteurs respiratoires et de donateurs d'électrons spécifiques. C'est ainsi que nous avons étudié l'effet de ces produits hormonaux sur la captation de Ca^{++} , d'une part en mettant en jeu les trois phosphorylations ($\text{P}_1 - \text{P}_2 - \text{P}_3$) en

utilisant le β -hydroxybutyrate comme substrat hydrogéné, en présence de malonate qui inhibe la succinodeshydrogénase; d'autre part en isolant les phosphorylations P_2 et P_3 en coupant la chaîne respiratoire au niveau de Fp_2 , et en rétablissant le flux d'électrons par le succinate; enfin, en faisant dépendre la captation de la seule phosphorylation P_3 , en inhibant la respiration au niveau du cytochrome b par l'Antimycine A et en la rétablissant par l'acide ascorbique + TMPD. Il était nécessaire d'utiliser ces inhibiteurs respiratoires afin d'éliminer toute oxydation des substrats endogènes et pour isoler ainsi spécifiquement les différentes phosphorylations.

D'autre part, on pouvait se demander si les effets des produits thyroïdiens n'étaient pas affectés par la présence de phosphate dans le milieu. En effet, le gonflement des mitochondries, qui a lieu avec les dérivés iodés et avec Ca^{++} étant aussi provoqué par PO_4^{3-} (137), il n'était pas impossible que l'action inhibitrice des produits hormonaux soit à rapporter, non à un effet de ceux-ci mais à des modifications de perméabilité consécutives à la présence de PO_4^{3-} .

C'est pourquoi nous avons étudié le rôle des différentes phosphorylations couplées aux oxydations sur les effets de TA_3 et T_3 sur la captation de Ca^{++} par les mitochondries, d'une part en milieu phosphaté assurant une captation massive de Ca^{++} et d'autre part en milieu non phosphaté, mais dans ce cas, la fixation limitée de cet ion reste faible.

1 - Essais en milieu phosphaté

Les mitochondries correspondant à 4 ou 5 mg de protéines sont incubées pendant 20 minutes à 30°C dans 3 ml d'un mi-

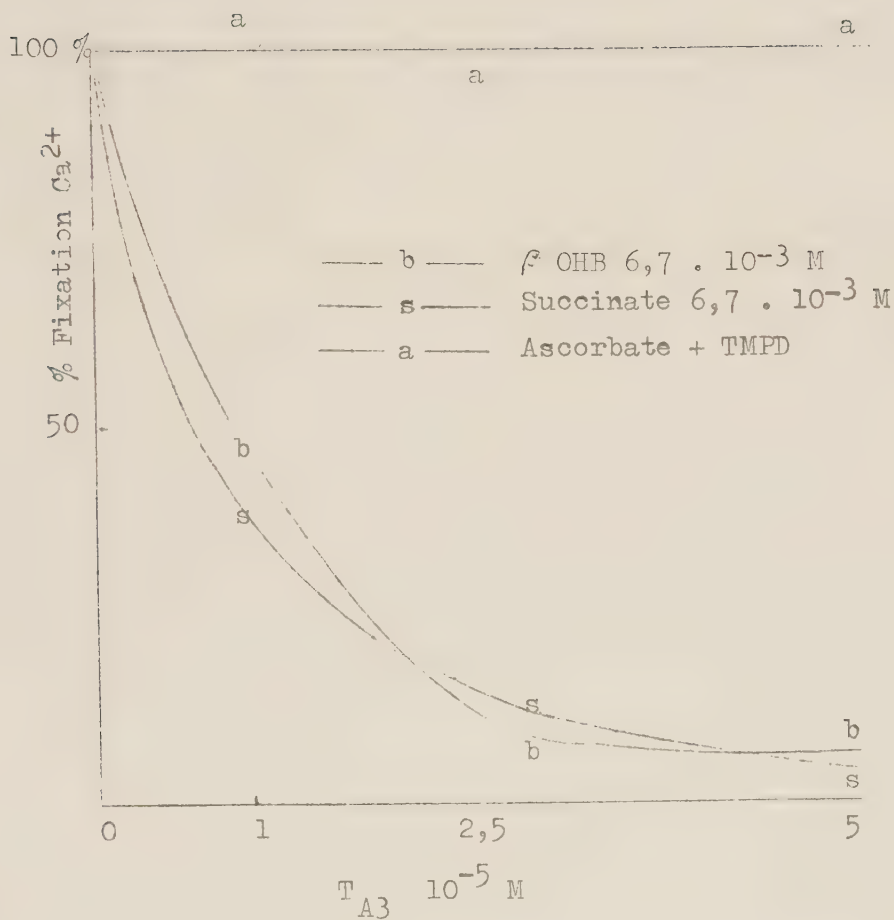


Figure 23 : Effets de concentrations croissantes de T_{A3} sur l'accumulation mitochondriale de Ca^{++} en présence soit de β -hydroxybutyrate (b), soit de succinate (s), soit d'Ascorbate - TMPD (a).

lieu saturé d'oxygène ayant la composition suivante :

PO_4HNa_2 4.10^{-3} M, Tris-ClH 5.10^{-3} M de pH 7, NaCl 8.10^{-2} M, MgCl_2 10^{-2} M, CaCl_2 marqué par ^{45}Ca $2,5.10^{-3}$ M, saccharose $1,66.10^{-2}$ M, ATP 3.10^{-3} M, T_3 ou TA_3 à des concentrations variables comprises entre 10^{-5} et 5.10^{-5} M et, suivant les cas :

- soit β -hydroxybutyrate de Na 2.10^{-2} M avec malonate 10^{-2} M,
- soit succinate de sodium $6,7.10^{-3}$ M et roténone 0,2 μ g/mg de protéines,
- soit ascorbate 3.10^{-2} M, TMPD 3.10^{-4} M et Antimycine A 0,1 μ g/mg de protéines.

Les résultats obtenus au cours de telles expériences sont rapportés dans les figures 23 et 24.

La figure 23 rend compte de l'influence de TA_3 à des concentrations comprises entre 1 et 5.10^{-5} M sur l'accumulation de Ca^{2+} en présence soit de β -hydroxybutyrate (b), soit de succinate (s), soit d'ascorbate-TMPD (a). Une concentration de TA_3 5.10^{-5} M empêche presque totalement la fixation de Ca^{++} avec les deux premiers substrats, alors que le produit iodé est sans effet avec l'ascorbate-TMPD.

La figure 24 traduit un résultat analogue obtenu avec T_3 , les substrats étant le β -hydroxybutyrate et l'ascorbate-TMPD. Les concentrations de T_3 utilisées sont comprises entre 10^{-5} M et $7,5.10^{-5}$ M. On constate avec le β -hydroxybutyrate une inhibition de la captation du cation voisine de 90 % pour une concentration de $7,5.10^{-5}$ M, alors qu'avec l'ascorbate, elle reste inférieure à 40 %.

Il apparaît donc qu'en milieu phosphaté, les produits thyroïdiens n'exercent une activité sur la captation mitochondriale de Ca^{++} , que dans des conditions mettant en jeu la deu-

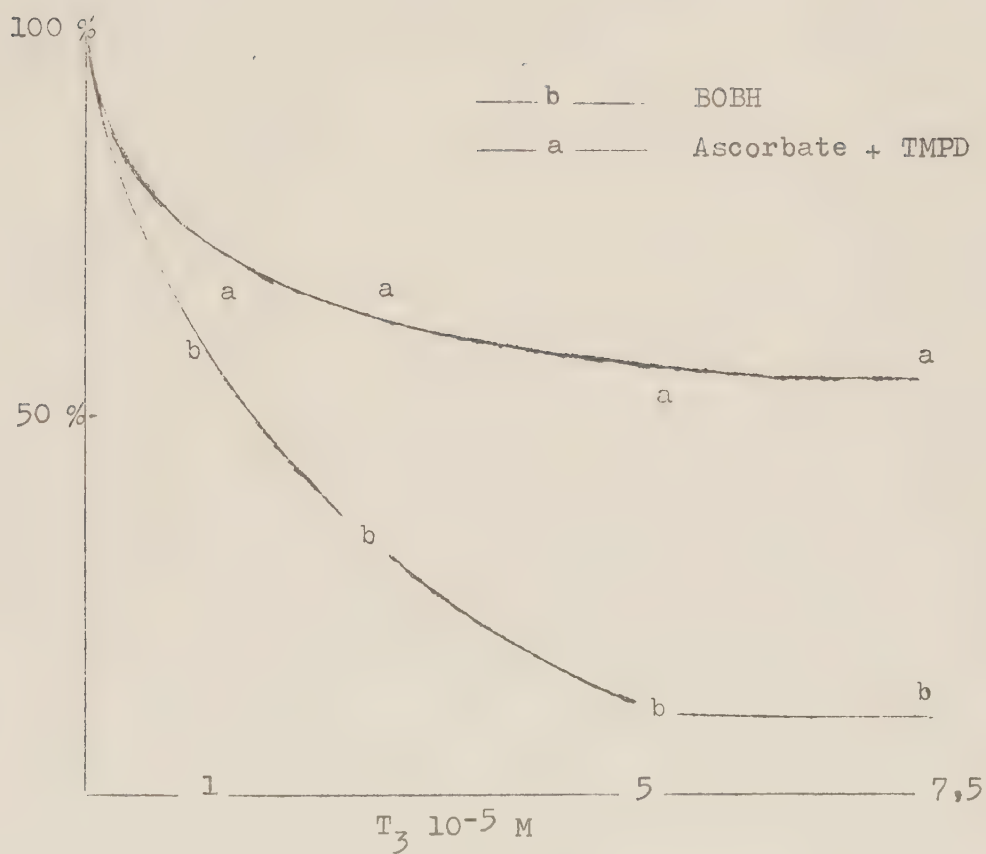


Figure 24 : Effets de concentrations croissantes de T_3 sur l'accumulation mitochondriale de Ca^{++} en présence soit de β -hydroxybutyrate (b), soit d'Ascorbate - TMPD (a).

xième phosphorylation P_2 couplée ; par contre, l'effet est supprimé lorsqu'on opère avec un substrat qui ne laisse subsister que la troisième phosphorylation. Ces faits mettent de nouveau en lumière l'importance de la deuxième phosphorylation et éventuellement de la première pour l'action mitochondriale des hormones thyroïdiennes.

2 - Essais en milieu non phosphaté

Nous avons commencé par effectuer des essais en suivant un protocole opératoire identique à celui adopté au cours des expériences en milieu phosphaté, en supprimant du milieu d'incubation PO_4HNa_2 , l'ATP, mais en augmentant la concentration du tampon Tris. A la suite de ces expériences, il nous est apparu qu'en l'absence d'ATP, les mitochondries étaient beaucoup plus fragiles, ce qui nous a obligé à modifier les conditions opératoires. Nous avons essentiellement abaissé la température et la durée d'incubation, les ramenant respectivement à $20^\circ C$ et à 4 minutes. D'autre part, en l'absence de phosphate la quantité de Ca^{++} fixée est limitée et la captation est très rapide. C'est pourquoi nous avons également pris la précaution lors des essais avec T_3 et TA_3 , de laisser incuber ceux-ci quelques minutes dans le milieu d'étude, en contact avec les mitochondries, avant d'ajouter Ca^{++} , de façon à ce que les produits hormonaux se fixent sur leurs sites d'action mitochondriaux. Enfin, il a été nécessaire de préciser dans ces conditions la captation mitochondriale de Ca^{++} en fonction de la concentration cationique, afin de déterminer les doses à mettre en oeuvre pour réaliser une captation optimum.

a - Influence de la concentration du milieu en Ca^{++} sur la captation de cet ion par les mitochondries

L'influence de la concentration en Ca^{++} sur sa captation

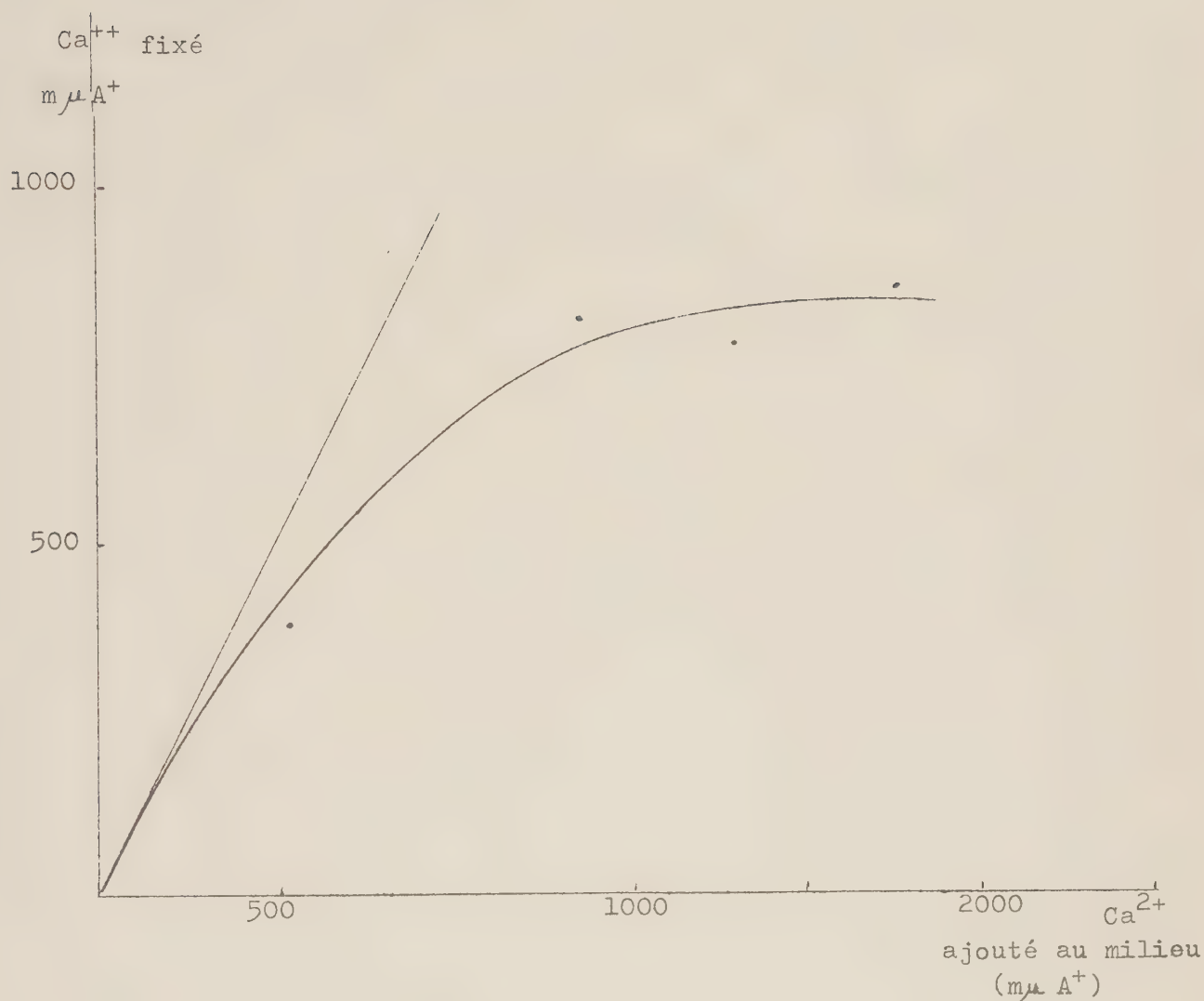


Figure 25 :

Influence de la concentration du milieu en Ca^{++} sur la captation de cet ion par les mitochondries, en l'absence de Phosphate et d'A.T.P. - Les conditions opératoires sont définies dans le texte.

mitochondriale, en milieu non phosphaté, a été étudiée au cours d'une série d'expériences réalisées en présence de doses croissantes de ce cation.

La suspension mitochondriale renfermant de 4 à 6 mg de protéines environ, est placée dans 3 ml d'une solution de composition suivante : Tris-ClH 2.10^{-2} M pH 7,2, NaCl 8.10^{-2} M, $MgCl_2$ 10^{-2} M, succinate de Na $6,7.10^{-3}$ M. L'incubation est réalisée à 20°C. Au temps initial, on ajoute des doses variables de Ca^{++} allant de 0,2 à 2,5 μ moles marquées par $^{45}Ca^{++}$. L'incubation est arrêtée au bout de 4 minutes en prélevant 2 ml de suspension dans un tube et en refroidissant rapidement dans la glace pilée. Après centrifugation à 0°C, la quantité de Ca^{++} fixée est déterminée par mesure de la radioactivité du liquide surnageant en suivant la technique décrite plus haut.

La figure 25 rapporte les résultats obtenus au cours d'un de ces essais. La courbe représentée, rend compte des variations de la quantité de Ca^{++} fixée par des prises d'essais de suspension mitochondriale correspondant à 4 mg de protéines en fonction de doses croissantes de Ca^{++} ajoutées au milieu d'incubation. Il apparaît que pour de faibles doses de Ca^{++} (jusqu'à 200 μ mole) la captation est totale, le surnageant ne présente plus aucune radioactivité. Puis si on augmente la concentration, la courbe s'infléchit pour arriver à un plateau correspondant à la saturation des mitochondries en Ca^{++} . Le plateau est atteint lorsque les particules ont fixé une quantité de Ca^{++} correspondant environ à 200 μ mole par mg de protéines mitochondriales. Cependant, cette quantité maximum ne peut être fixée que si le milieu contient au moins 1500 μ mole ce qui correspond environ au double de ce qui peut être capté

par la prise d'essai de suspension mitochondriale. Dans ces conditions, il persiste en fin d'expérience une forte radioactivité dans le surnageant.

Le choix des concentrations en Ca^{++} , utilisées pour tester l'effet des produits thyroïdiens sera conditionné par la technique de mesure adoptée pour la détermination de la quantité de Ca^{++} fixée. En effet, si les mesures de radioactivité sont faites sur le culot mitochondrial, il est préférable d'utiliser des concentrations permettant d'atteindre le plateau de saturation. Par contre, si on effectue les mesures de radioactivité sur le surnageant, la méthode sera d'autant plus sensible que la différence entre un témoin sans mitochondrie et les essais est grande. Dans ce cas, il est préférable de se placer dans des conditions correspondant à la partie linéaire de la courbe. Comme nous avons poursuivi en général notre étude en effectuant la mesure de la radioactivité sur le surnageant, nous avons utilisé une dose de Ca^{++} de 600 m μ mole qui permet une captation de l'ordre de 120 m μ mole de Ca^{++} par mg de protéines et ne laisse subsister dans le surnageant en fin d'expérience que 15 à 20 % de la radioactivité présente au temps initial. Dans les conditions adoptées, l'addition de 600 m μ mole de Ca^{++} assure une concentration de $0,2 \cdot 10^{-3}$ M dans le milieu.

b - Effets de T_3 et de TA_3 sur la captation mitochondriale de Ca^{++} en milieu non phosphaté

Les suspensions particulières renfermant environ 4 mg de protéines sont placées dans 3 ml d'une solution saturée d'oxygène dont la composition est : Tris-ClH $2 \cdot 10^{-2}$ M pH 7,2, NaCl $8 \cdot 10^{-2}$ M, MgCl_2 10^{-2} M, saccharose $1,66 \cdot 10^{-2}$ M et un substrat hydrogéné. On a utilisé comme donneur d'hydrogène :

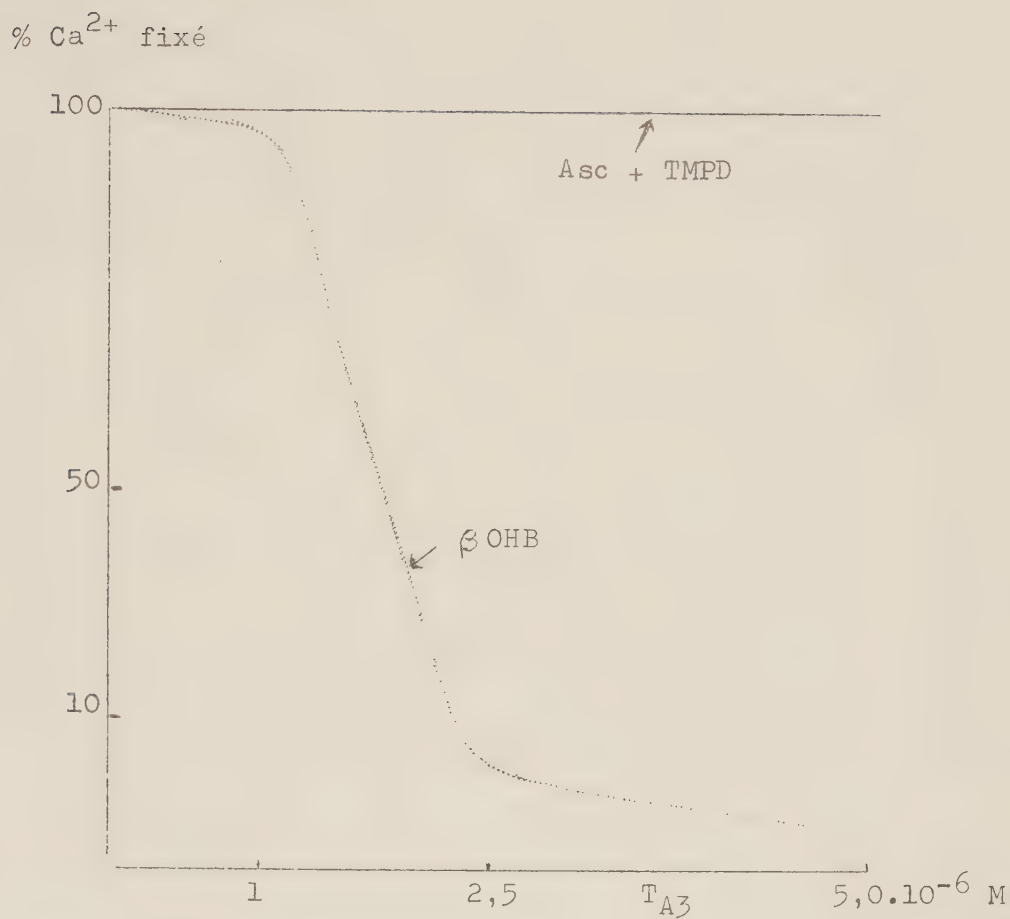


Figure 26 : Effets de concentrations croissantes de $\text{T}_{\text{A}3}$ sur la captation mitochondriale de Ca^{++} en présence de β -hydroxybutyrate ou d'Ascorbate - TMPD en milieu non phosphaté.

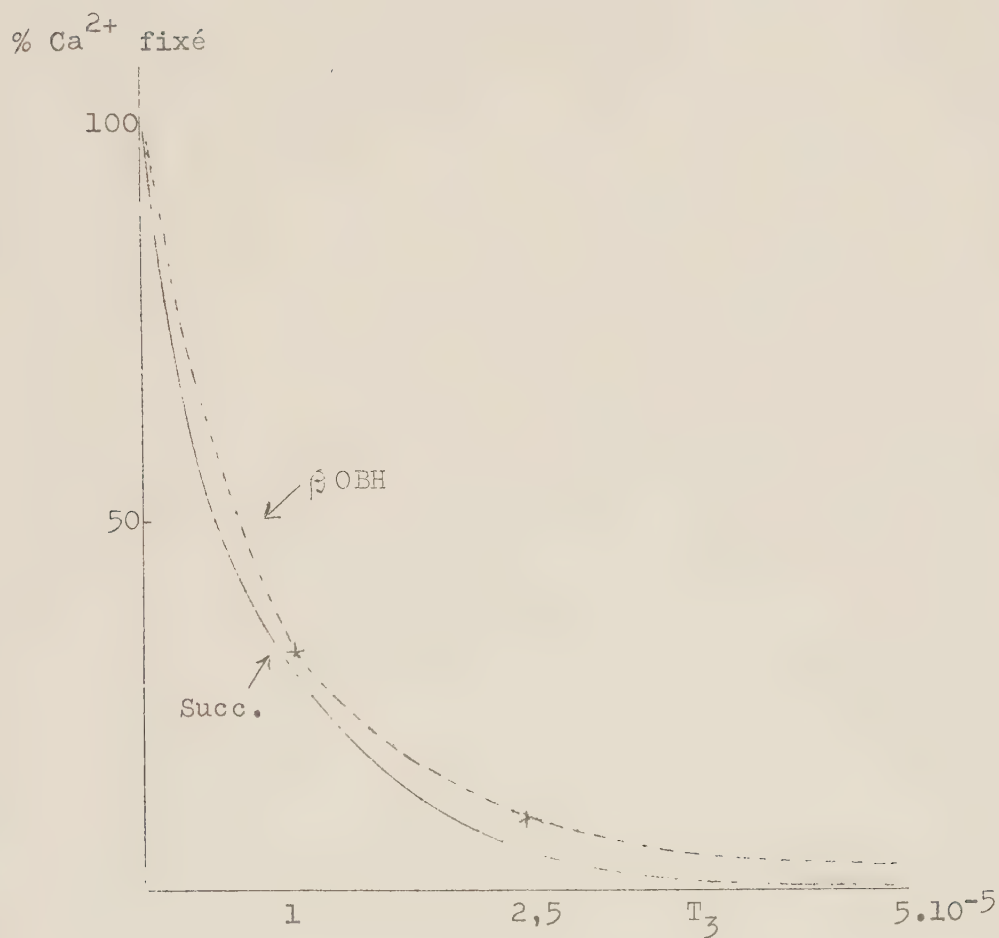


Figure 27 : Effets de concentrations croissantes de T_3 sur la captation mitochondriale de Ca^{++} en présence de β hydroxybutyrate ou de succinate, en milieu non phosphaté.

- soit le succinate de sodium $6,7.10^{-3}$ M avec roténone $0,2 \mu\text{g/mg}$ de protéines,
- soit le β -hydroxybutyrate 2.10^{-2} M avec acide malonique 2.10^{-3} M,
- soit l'acide ascorbique 3.10^{-2} M, TMPD 3.10^{-4} M avec Anti-mycine A $0,1 \mu\text{g/mg}$ de protéines. L'incubation est réalisée à 20°C . Au temps initial, on ajoute T_3 ou TA_3 à des concentrations variables, après 4 minutes, $0,6 \mu\text{mole}$ de Cl_2Ca marqué par ^{45}Ca . L'incubation est arrêtée 4 minutes plus tard en prélevant 2 ml de suspension dans un tube et en refroidissant rapidement dans la glace pilée. Après centrifugation, les mesures de radioactivité sont effectuées sur le liquide surnageant.

Dans les conditions expérimentales adoptées, la concentration finale de Ca^{++} est de 2.10^{-4} M ; pratiquement la totalité du cation est captée par les mitochondries quel que soit le substrat employé. On a représenté sur la figure 26 les effets de concentrations variables de TA_3 sur la captation mitochondriale de Ca^{++} en présence de β -hydroxybutyrate ou d'ascorbate-TMPD. Lorsque le substrat est le β -OH-B, on constate que TA_3 inhibe la captation de Ca^{++} , l'effet inhibiteur augmentant avec la concentration du produit iodé et atteignant 90 % avec 5.10^{-6} M. Par contre, avec l'ascorbate-TMPD, TA_3 , aux mêmes doses ne s'oppose plus à l'accumulation du cation.

Des essais identiques ont été réalisés avec T_3 , les résultats obtenus sont rapportés sur les figures 27 et 28. La figure 27 traduit les effets de doses croissantes de T_3 sur la captation de Ca^{++} en présence de β -OH-B et de succinate comme substrat. On constate que T_3 provoque une inhibition du phénomène. Cet effet, proportionnel à la concentration de T_3 , atteint 100 % avec 5.10^{-5} M. Par contre, les résultats représen-

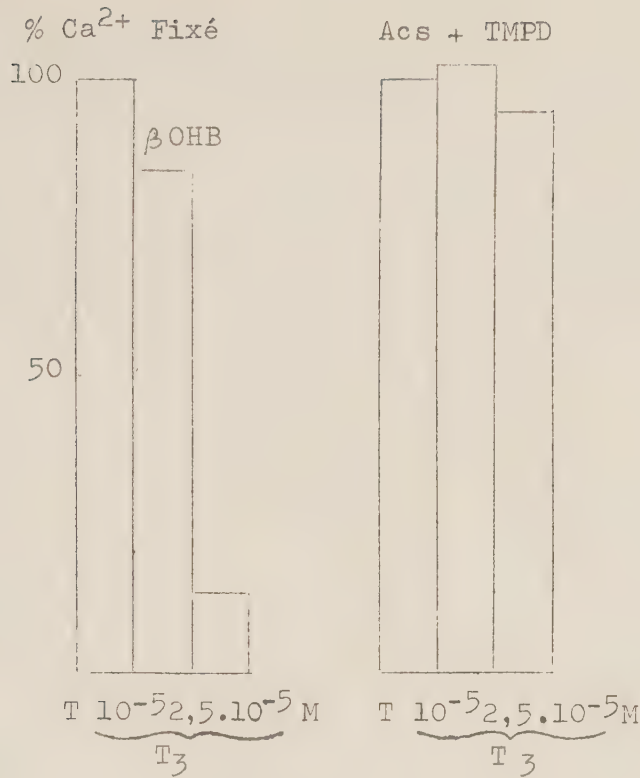


Figure 28 : Effets de concentrations croissantes de T₃ sur la captation de Ca⁺⁺ en présence de β-hydroxybutyrate ou d'Ascorbate-TMPD, en milieu non phosphaté.

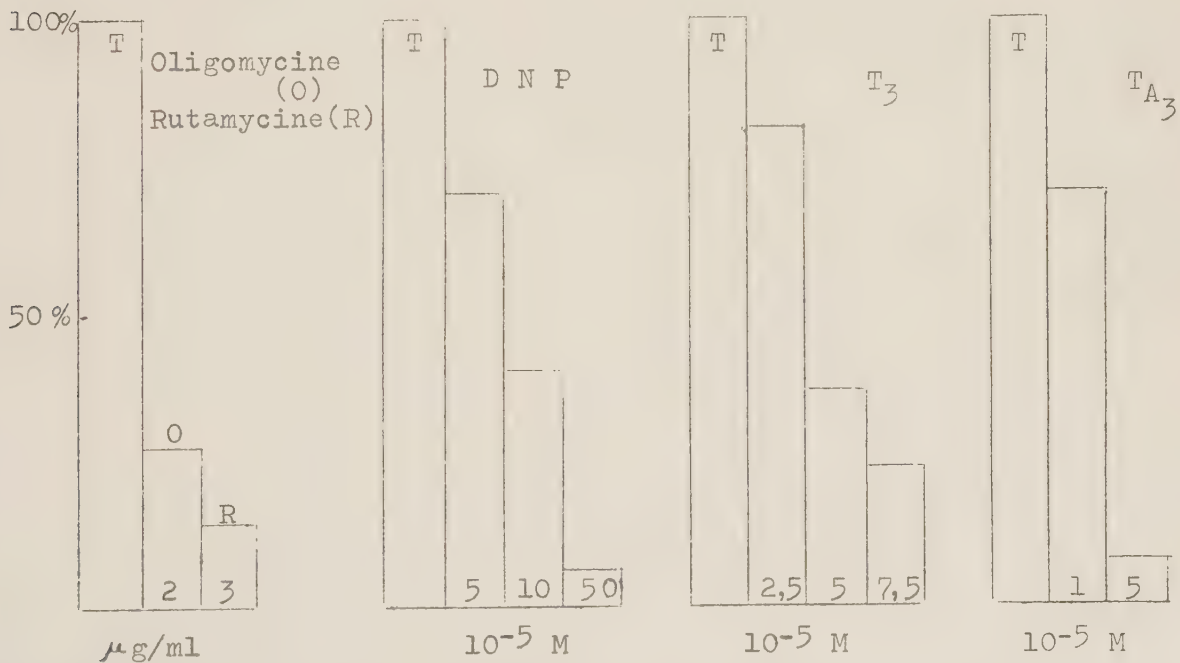


Figure 29 : Effets de l'Oligomycine, de la Rutamycine, du DNP, de T₃ et de T_{A3} sur la captation mitochondriale de Ca⁺⁺ par la voie ATPasique.

tés sur la figure 28 permettent de comparer les effets de T_3 sur la captation de Ca^{++} en présence de β -OH-B et d'acide ascorbique-TMPD. Il apparaît alors que l'hormone aux concentrations utilisées ne s'oppose plus à l'accumulation du cation, lorsque le substrat est l'acide ascorbique-TMPD, alors qu'aux mêmes concentrations le produit iodé produit son effet habituel sur la captation en présence de β -OH-B.

T_3 et TA_3 provoquent donc la même réponse sur la captation de Ca^{++} en milieu phosphaté ou non ; ils exigent que la deuxième phosphorylation soit couplée aux oxydations. Il convient néanmoins de remarquer que dans ces conditions TA_3 manifeste son activité à des concentrations 10 fois plus faibles que celles nécessaires à ses effets en milieu phosphaté, par contre T_3 présente la même activité dans les deux cas.

Il ressort donc de ces expériences que les hormones thyroïdiennes s'opposent à la fixation active de Ca^{++} par les mitochondries, que le milieu soit phosphaté ou non. Cependant, cet effet semble plus marqué en l'absence de phosphate puisque TA_3 empêche presque complètement la captation de Ca^{++} à une concentration 10 fois moindre que celle efficace en milieu phosphaté. Enfin, dans les deux cas, les produits thyroïdiens n'exercent une action inhibitrice que si la phosphorylation couplée au transfert des électrons dans la région du cytochrome b, demeure active.

IV - INFLUENCE DES PRODUITS THYROIDIENS SUR LA CAPTATION MITOCHONDRIALE DE Ca^{++} PAR LA VOIE ATPASIQUE

La captation de Ca^{++} par les mitochondries peut être conduite également en l'absence de substrat et de respiration

mais en présence d'un excès d'ATP. Nous avons de la même façon étudié les effets des hormones thyroïdiennes sur la voie ATPasique en les comparant à ceux du 2-4-dinitrophénol, de l'oligomycine et de la rutamycine.

Les expériences ont été réalisées dans des conditions analogues à celles utilisées lors des essais en milieu phosphaté. Les mitochondries (3 à 5 mg) sont incubées à 30°C pendant 20 minutes dans 3 ml d'un milieu renfermant : Tris-ClH 2.10^{-2} M pH 7, NaCl 8.10^{-2} M, $MgCl_2$ 10^{-2} M, Na_2HPO_4 4.10^{-3} M, $CaCl_2$ marqué par ^{45}Ca $2,5.10^{-3}$ M, saccharose $1,66.10^{-2}$ M, ATP $1,5.10^{-2}$ M, et les divers inhibiteurs à des concentrations variables.

La figure 29 rend compte des résultats obtenus. Ceux-ci font apparaître un effet inhibiteur des produits iodés proportionnel à la concentration utilisée. Cette inhibition est comparable à celle obtenue avec le DRN, mais elle est presque totale pour des doses 5 à 10 fois inférieures.

Sur la figure 29 sont également rapportés les effets de la Rutamycine, comparativement à ceux de l'Oligomycine sur la captation de Ca^{++} par cette voie ATPasique. L'un et l'autre exercent un effet inhibiteur d'intensité comparable ; ces résultats confirment la similitude d'action de ces deux antibiotiques que nous avons déjà observée sur les ATPases mitochondriales.

DISCUSSION

De l'ensemble de nos expériences, il ressort que les hormones thyroïdiennes s'opposent à la captation de Ca^{++} par les mitochondries, aussi bien par la voie respiratoire que par

la voie ATPasique, le milieu étant phosphaté ou non. On peut se demander quel est le mécanisme de cette inhibition.

Un effet séquestrant des produits hormonaux peut être exclu a priori puisque ceux-ci agissent à des concentrations qui sont plus de deux cents fois inférieures à celles de Ca^{++} . De la même façon, la présence d'iodure consécutive à une des-halogénéation éventuelle de T_3 ou TA_3 ne doit pas être retenue puisque l'addition d'IK à la même concentration est sans effet. Par contre, l'effet inhibiteur d'ICN sur la fixation de Ca^{++} , comparable à celui de T_3 ou de TA_3 , met à nouveau en évidence une similitude d'action entre les produits hormonaux thyroïdiens et les donateurs d'ions I^+ .

En réalité, l'origine de l'effet des produits thyroïdiens sur la captation de Ca^{++} par les mitochondries doit être recherchée au niveau de facteurs énergétiques liés aux oxydations phosphorylantes.

Le fait que l'Oligomycine est inactive sur la captation par la voie respiratoire et inhibitrice par la voie ATPasique, signifie vraisemblablement que l'étape au cours de laquelle s'opère la fixation de Ca^{++} précède l'apparition du dérivé phosphorylé. Les expériences en milieu non phosphaté confirment d'ailleurs cette hypothèse : les mitochondries bien lavées renfermant moins de 0,02 μmole de PO_4^{3-} par mg de protéines (158) et la quantité de Ca^{++} fixée étant alors de 0,2 μmole , il faut admettre que la captation de Ca^{++} n'est pas liée à la décomposition d'un intermédiaire phosphorylé.

Dans les réactions de transfert d'énergie, la phosphorylation n'intervient qu'après formation temporaire d'un (94, 95) ou de deux intermédiaires (30) assurant le couplage

des réactions de phosphorylation au transfert des électrons. Ce sont donc ces étapes de couplage qui sont responsables de la fixation active de Ca^{++} par les mitochondries et l'inhibition par les produits iodés doit, en conséquence, s'effectuer sur ces mêmes intermédiaires.

Dès lors, on conçoit que les produits thyroïdiens se conduisent apparemment comme le DNP en inhibant la captation de Ca^{++} par les deux voies énergétiques.

Néanmoins ces deux types de composés se distinguent de façon très nette : tandis que le DNP se comporte comme le découplant type, agissant sur chaque site de phosphorylation, les produits thyroïdiens inhibent la captation de Ca^{++} à condition que la seconde phosphorylation, et peut être la première, soit assurée.

Ces résultats ne sont pas sans rappeler ceux obtenus lors des expériences de gonflement mitochondrial sous l'influence des hormones thyroïdiennes et de Ca^{++} . En effet, il suffit qu'une phosphorylation soit assurée pour que l'ion Ca^{++} induise le gonflement mitochondrial et soit capté activement ; par contre la deuxième phosphorylation s'avère nécessaire aux effets des produits thyroïdiens tant sur la morphologie que sur le transport ionique des mitochondries. Quant au DNP, il se différencie essentiellement des produits iodés en s'opposant à leurs effets sur la morphologie mitochondriale.

Il semble que l'inhibition de la captation de Ca^{++} par les mitochondries sous l'effet des produits thyroïdiens procède du même mécanisme que celui qui a trait à leur comportement sur la morphologie de ces particules. Les produits thy-

roïdiens formeraient un dérivé transitoire avec le deuxième facteur de couplage (X ~ I) qui est considéré maintenant comme l'intermédiaire énergétique qui retient temporairement Ca^{++} avant sa précipitation sous forme d'hydroxyapatite (35). Ce serait donc à ce niveau que s'exercerait une compétition entre Ca^{++} et les composés thyroïdiens, laquelle jouerait instantanément en faveur de ceux-ci.

TROISIEME PARTIE

-:-

INFLUENCE DES PRODUITS THYROIDIENS ET DE Ca^{++} SUR LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE ET SUR L'ETAT D'OXYDO-REDUCTION DU NICOTINAMIDE-ADENINE- DINUCLEOTIDE (NAD)

-:-

INTRODUCTION

L'addition de Ca^{++} à une suspension de mitochondries comporte la fixation de l'ion, ce qui provoque des modifications morphologiques et un changement de l'état thermodynamique des particules. En effet, lorsque des mitochondries fraîchement préparées, sont placées dans un milieu tamponné isotonique contenant un substrat hydrogéné, conditions définies par CHANCE comme étant l'état 4, l'intensité respiratoire est très faible (29, 30). Si dans ces conditions on ajoute une faible concentration de Ca^{++} , on constate une brusque activation de la consommation d'oxygène avec retour à l'état initial dès que cesse la fixation calcique (34, 135, 158, 165). A chaque addition de Ca^{++} correspond une nouvelle "flambée" respiratoire. Cependant, à partir d'une certaine concentration en cations, le caractère cyclique du phénomène disparaît. On n'observe plus de retour à l'état initial, mais une intensité respiratoire élevée persiste et tend même à s'exagérer. Une action aussi nette de Ca^{++} sur la respiration mitochondriale ne devait pas manquer de se manifester sur l'état d'oxydo-réduction des coenzymes respiratoires. En effet, l'activation réversible de la consommation d'oxygène, sous l'effet d'addition de faibles doses de Ca^{++} , s'accompagne d'une brusque oxydation des coenzymes de la chaîne respiratoire, suivie également d'un

retour à l'état initial lorsque la totalité du cation ajouté a été captée par les mitochondries (34).

De plus, c'est un fait bien établi que les produits thyroïdiens produisent une élévation de la consommation d'oxygène, aussi bien chez l'animal, qu'in vitro sur les particules mitochondriales (154). Ces faits font apparaître une certaine analogie entre les effets de Ca^{++} et des produits iodés sur les mitochondries, les uns et les autres augmentant l'intensité respiratoire de ces particules.

Dès lors on pouvait se demander quel serait l'effet de l'association des produits thyroïdiens et de Ca^{++} sur la consommation d'oxygène des mitochondries placées dans l'état 4. Produirait-elle une accélération plus intense ou plus durable que celle obtenue par chacun des corps pris séparément, ou bien au contraire, les hormones s'opposant à la pénétration de Ca^{++} dans les mitochondries, l'effet respiratoire de ce dernier serait-il supprimé ?

Nous nous sommes proposé, en premier lieu, d'étudier la consommation d' O_2 de mitochondries utilisant soit leur substrat endogène, soit dans des conditions où la respiration, après avoir été arrêtée par divers inhibiteurs, est rétablie par l'addition de substrats hydrogénés bien déterminés.

Nous avons entrepris ensuite l'étude des effets de T_3 et de TA_3 associés à Ca^{++} , d'une part sur la respiration des mitochondries et d'autre part sur l'état d'oxydo-réduction du nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD).

PREMIER CHAPITRE

-:-

EFFETS DE Ca^{++} ET DES PRODUITS THYROIDIENS SUR LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE

-:-

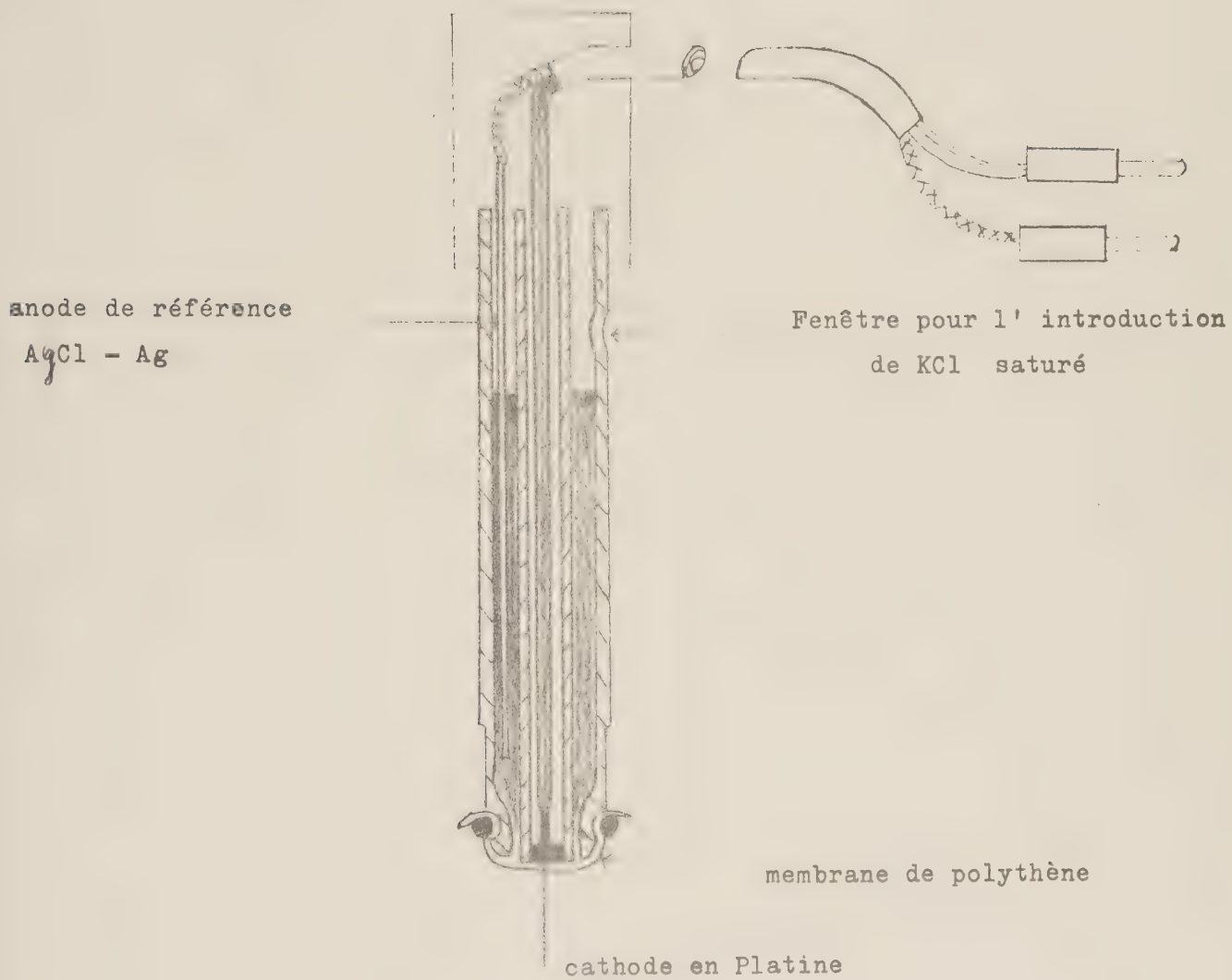
I - Conditions expérimentales

L'étude de l'activité respiratoire d'une suspension mitochondriale peut être effectuée soit à l'aide de méthodes manométriques comme celle de Warburg, soit par des méthodes polarographiques. Nous avons préféré utiliser ces dernières qui présentent l'avantage d'étudier le phénomène "en continu" et de mettre en évidence des modifications extrêmement brèves de la consommation d'oxygène.

Les premiers essais de dosage de l'oxygène dissous, par analyse polarographique, furent réalisés par DAVIS et BRONK (45) avec une électrode de platine, d'abord tournante puis oscillante, cette dernière présentant par sa forme et ses oscillations un certain nombre d'avantages : accroissement de la sensibilité, temps de réponse plus rapide. Ce type de dosages "oxygraphique" reçut quelques applications et c'est ainsi que CHANCE étudia la respiration enzymatique au cours des phénomènes de phosphorylation oxydative (29, 30, 33).

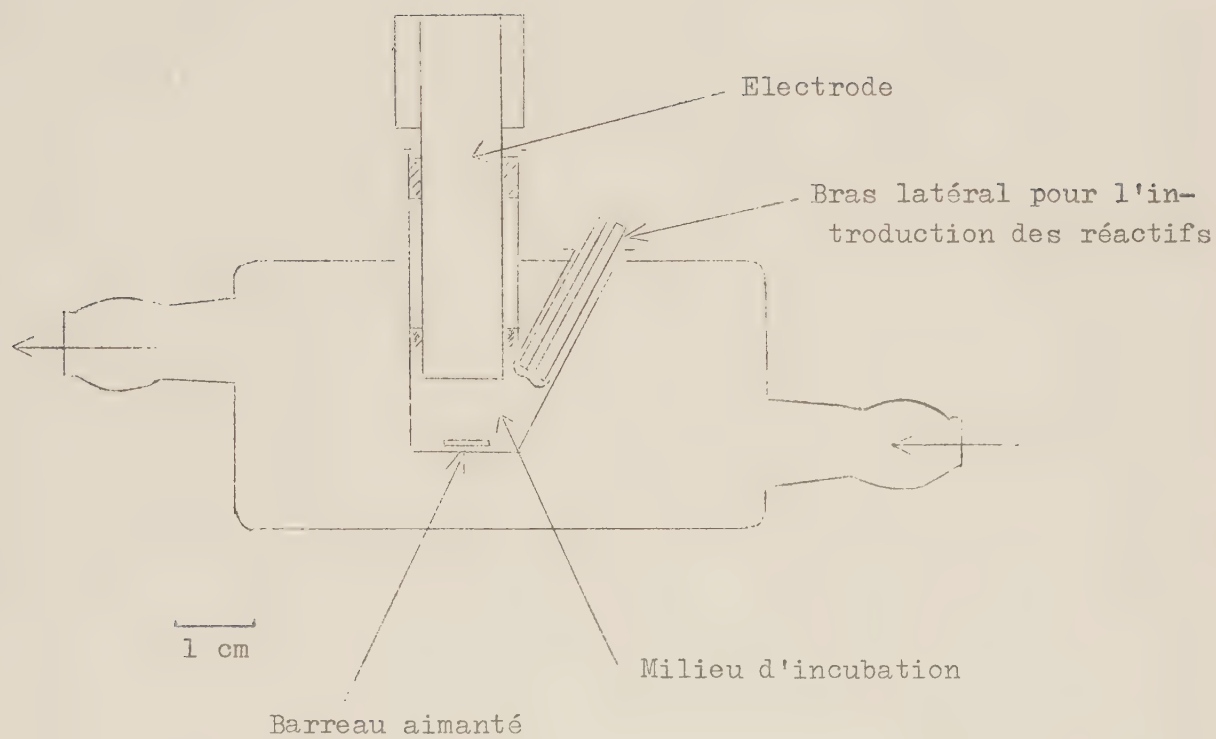
L'appareillage que nous avons utilisé comporte, soit une électrode vibrante de platine recouverte de polyéthylène, reliée à une anode de référence au calomel, soit l'électrode originale de Clark, platine-argent. Le système d'amplification

Figure 30 : ELECTRODE DE CLARK



et d'enregistrement est le même quelle que soit l'électrode utilisée. Nous avons employé dans quelques expériences l'électrode vibrante décrite par CHANCE qui nécessite une concentration en mitochondries voisins de celle mise en oeuvre lors de nos essais sur le gonflement actif des particules. Par contre, des essais préliminaires entrepris sur l'action respiratoire de Ca^{++} par mesure polarographique de l'oxygène dissous au moyen de l'électrode vibrante de platine, ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats constants, sans doute à cause des faibles quantités de mitochondries mises en oeuvre, comme l'exigeait cette technique. Aussi avons nous utilisé par la suite, l'électrode initiale de CLARK (72), Yellow Spring Instrument Co, adaptée au dispositif d'enregistrement G.M.E. La plupart de notre travail ayant été réalisé avec l'électrode de Clark, nous nous bornerons à donner les conditions d'emploi de celle-ci.

Cette électrode de Clark est représentée schématiquement sur la figure 30. Elle est constituée d'une cathode de platine en contact par l'intermédiaire d'une solution saturée de ClK , avec une anode de référence AgCl-Ag . Son extrémité plongeant dans le milieu d'incubation est recouverte d'une fine membrane de polyéthylène, laissant diffuser l'oxygène mais empêchant notamment les protéines de se fixer sur la cathode, ce qui provoquerait une diminution de sensibilité et une grande irrégularité des tracés. Ainsi cette membrane rend l'électrode pratiquement indifférente à la composition du milieu, excepté à sa composition en oxygène. Cette électrode est placée dans une cellule thermostatée, contenant le milieu d'incubation, et maintenue dans celle-ci grâce à un manchon de caoutchouc servant de joint. Elle doit être suffisamment engagée dans la cellule de façon à ce qu'une distance de 7 à 10 mm sépare l'ex-



SCHEMA DE LA CELLULE THERMOSTATEE

(Figure 31)

trémité capuchonnée du fond de la cuve. La cellule thermostatée représentée schématiquement sur la figure 31 est munie d'un bras latéral permettant l'introduction des réactifs. Un tube capillaire monté dans un capuchon en caoutchouc est embouti dans le bras latéral, de façon à le fermer hermétiquement. L'addition des réactifs s'effectue à l'aide d'une micro-seringue munie d'une aiguille longue et fine, pouvant pénétrer dans le tube capillaire et percer le caoutchouc recouvrant celui-ci. Grâce à ce dispositif, l'échange entre le milieu d'incubation et l'atmosphère est relativement faible. L'homogénéité du milieu d'incubation est assurée par la rotation, à l'aide d'un agitateur magnétique, d'un petit barreau en acier recouvert de téflon. La cellule est thermostatée par une chambre enveloppante dans laquelle circule un courant d'eau dont on règle la température à l'aide d'un thermostat externe.

La tension de polarisation constante et stable, établie à travers l'électrode de mesure a été choisie à 0,65 Volts par rapport à l'anode de référence Ag-AgCl ; elle est assurée par un circuit polarisant conventionnel. A ce potentiel, les variations d'intensité dépendent spécifiquement de la concentration en oxygène du milieu.

Le corps principal de l'appareil est complété par un système d'enregistrement automatique dont on peut faire varier la vitesse de déroulement. La largeur des bandes de papier est de 40 cm.

Les mesures de consommation d'oxygène par les préparations mitochondriales ne peuvent être effectuées qu'après étalonnage de l'appareil. Cette opération est réalisée, d'une part à l'aide d'une solution tamponnée saturée d'oxygène et d'autre part à l'aide de ce même tampon privé de ce gaz par un

système glucose-glucose oxydase ou acide succinique-succinodéshydrogénase. Le tampon utilisé est une solution de phosphate 0,05 M de pH 7,4 que l'on sature d'oxygène, en faisant barboter pendant 2 heures à la température du laboratoire, de l'air purifié par passage successivement à travers SO_4H_2 et NaOH concentrés puis eau distillée et Cl_2Ca . Avant usage, on laisse ce tampon ainsi saturé, s'équilibrer dans un bain-marie thermostaté réglé à la température à laquelle l'expérience doit être réalisée. Nous avons d'une façon générale travaillé à 20°C, dans ces conditions 1 ml de ce tampon renferme 0,25 μmole d'oxygène.

La cellule d'incubation étant remplie d'eau et l'électrode étant correctement placée, on établit la tension de polarisation entre la cathode et l'anode. Après 15 minutes environ, la cuve est débarrassée de l'eau distillée grâce à une micropipette reliée à une trompe à vide, puis rincée avec le tampon. Après plusieurs rinçages, on introduit par le bras latéral de la cellule muni de son tube capillaire 2,3 ml de ce même tampon saturé d'oxygène. L'agitateur magnétique entraînant le barreau aimanté placé dans la cuve est mis en marche ainsi que le système d'enregistrement dont la vitesse de déroulement a été choisie de 12 mm par minute. La ligne de départ de l'enregistrement est réglée à 5 cm de la partie supérieure de la feuille de papier. Après 2 à 3 minutes d'attente pour vérifier que le tracé est bien régulier, on ajoute successivement 0,1 ml de D-Glucose 0,8 % puis 10 μl d'une solution de catalase à 1 %. En dernier lieu est ajoutée la solution de glucose-oxydase à 1 % dans le tampon phosphaté, à plusieurs reprises et de telle sorte que tout l'oxygène du milieu soit épuisé. La ligne obtenue en fin d'expérience correspond donc à 0 % de la concentration en oxygène, elle est ajustée à 5 cm

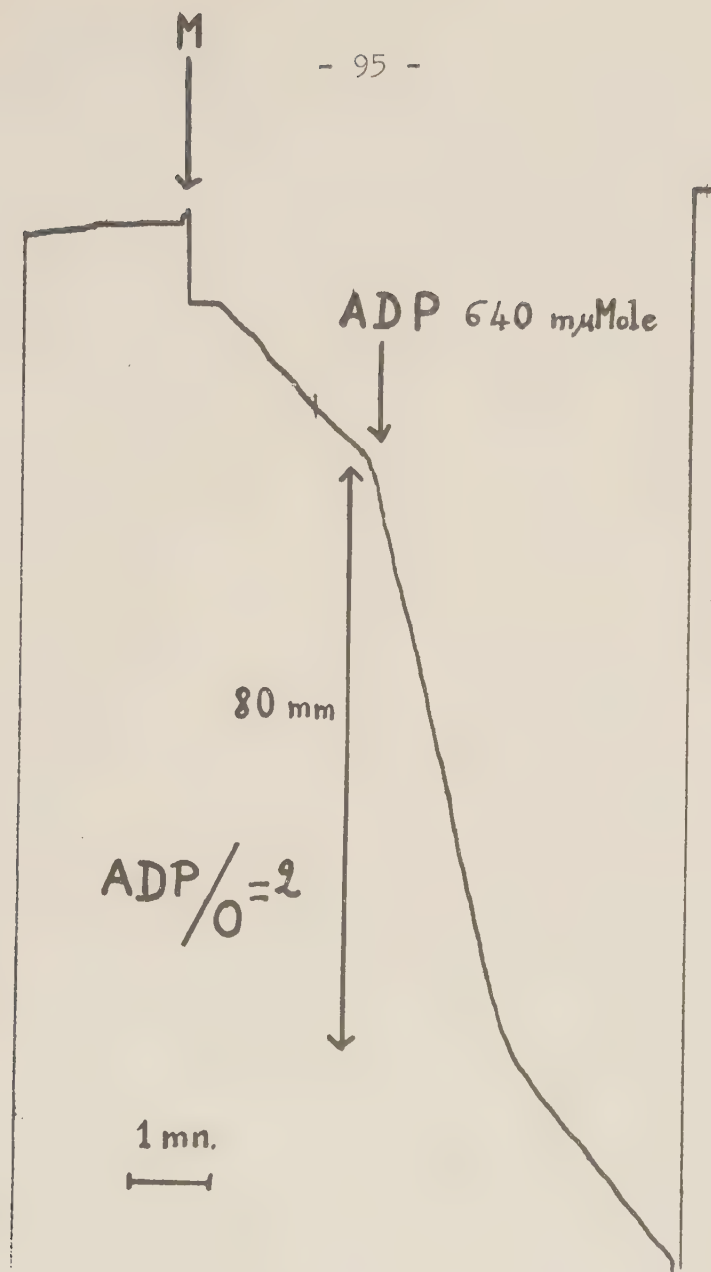


Figure 32 : Enregistrement oxygraphique de l'effet de l'ADP sur la respiration mitochondriale, en présence de succinate $6,3 \cdot 10^{-3}$ M comme substrat et de Roténone $0,67 \mu\text{g/ml}$ dans un milieu tampon K_2HPO_4 $13 \cdot 10^{-3}$ M ; KHPO_4 $3 \cdot 10^{-3}$ M ; Mg Cl_2 $6 \cdot 10^{-3}$ M ; KCl $58 \cdot 10^{-3}$ M ; NaCl $26 \cdot 10^{-3}$ M ; NaF $12 \cdot 10^{-3}$ M.

(Volume final = 2,3 ml). En M addition des mitochondries (7 mg de protéines).

de la partie inférieure de la feuille de papier. Les variations entre 0 et 100 % de l'oxygène dissous correspondent ainsi à un dénivelé de 30 cm sur l'enregistrement. Il est alors possible en tenant compte du volume des solutions mises en oeuvre, de calculer à partir du tracé graphique, la quantité d'oxygène consommée représentée par 1 cm de dénivellation. En effet, comme la quantité d'oxygène dissous à 20°C dans les solutions aqueuses de faible concentration ionique est environ de $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mole par ml, pour un volume de 2,3 ml, elle est de $5,75 \cdot 10^{-7}$ Mole, 1 cm de dénivellation correspond sensiblement à $2 \cdot 10^{-8}$ Mole d'oxygène.

La mesure de la consommation d'oxygène des préparations mitochondriales est conduite d'une façon identique. On place dans la cuve 2 ml de tampon préalablement saturé d'oxygène et équilibré à la température de 20°C, puis 300 μ l de suspension mitochondriale dans le saccharose 0,25 M, correspondant à 6 à 8 mg de protéines. A titre d'exemple, la courbe représentée sur la figure 32 a été obtenue au cours d'une de ces expériences. Le tampon utilisé est le tampon de Chance : K_2HPO_4 $13 \cdot 10^{-3}$ M, KH_2PO_4 $3 \cdot 10^{-3}$ M, $MgCl_2$ $6 \cdot 10^{-3}$ M, KCl $58 \cdot 10^{-3}$ M, NaCl $26 \cdot 10^{-3}$ M, NaF $12 \cdot 10^{-3}$ M renfermant en outre succinate de sodium $6,3 \cdot 10^{-3}$ M et Roténone 0,67 μ g par ml. L'addition des mitochondries provoque une diminution régulière de la concentration en oxygène du milieu, due à la respiration des particules ainsi placées dans l'état 4 de CHANCE. Si l'on ajoute de l'ADP (état 3) la consommation d'oxygène augmente brusquement et cette vitesse élevée persiste tant que le nucléotide n'est pas entièrement phosphorylé. Lorsque l'ADP a été entièrement transformé en ATP, la respiration reprend alors sa vitesse initiale. Il est alors aisé de mesurer la quantité d'oxygène consommée simultanément à la phosphorylation des 0,64 μ mole

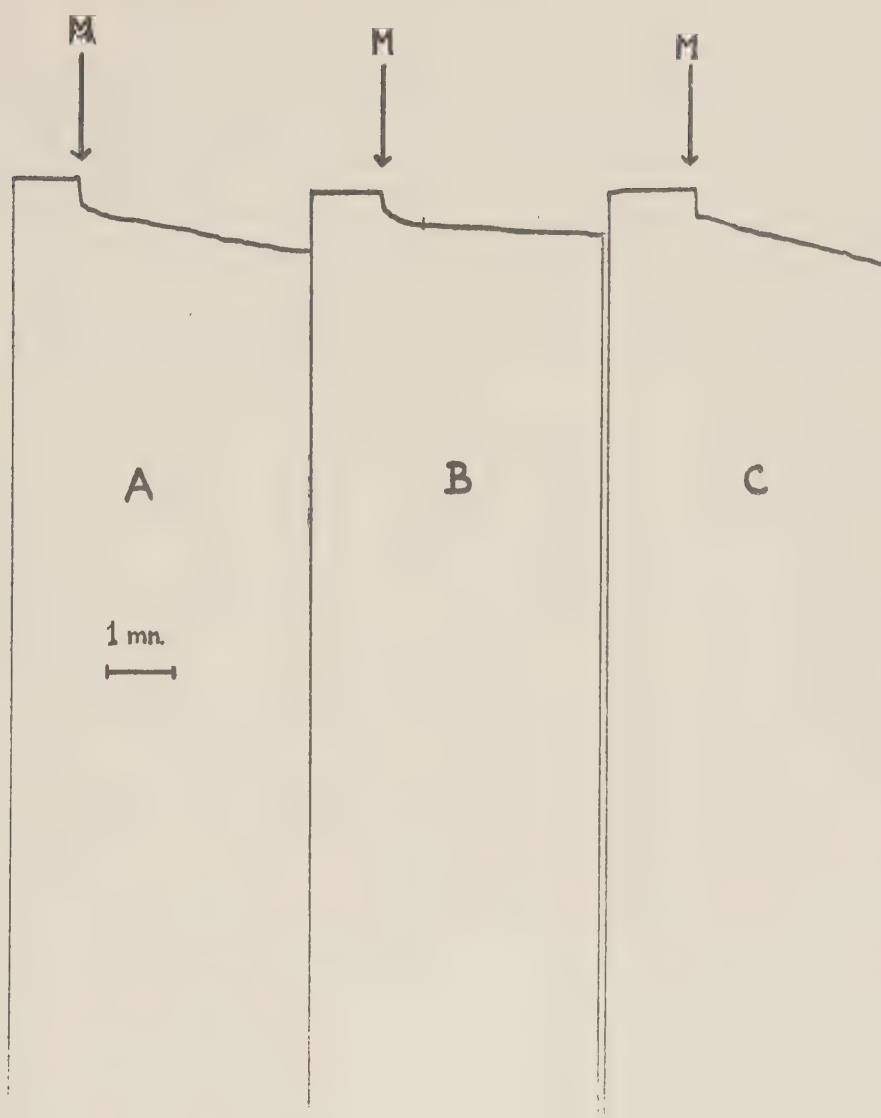


Figure 33 : Mesure polarographique de la consommation d'oxygène par les particules mitochondriales (0,5 mg de protéines) placées dans un tampon Tris 0,02 M ; KCl 0,125 M pH 7,4. (Volume final = 1,6 ml).

A : En l'absence de Roténone

B : En présence de Roténone 0,67 μ g/ml

C : En présence de Roténone 0,67 μ g/ml et de succinate $6,3 \cdot 10^{-3}$ M

d'ADP ajoutée, ce qui permet de déterminer le rapport $\frac{ADP}{O}$. Ici il est de 2, ce qui est conforme à l'oxydation phosphorylante du succinate.

II - Vérification de l'effet inhibiteur de la Roténone et de l'Antimycine A

A l'aide de cette technique oxygraphique, nous avons vérifié que les inhibiteurs respiratoires (Roténone-Antimycine A) utilisés au cours des expériences de gonflement mitochondrial et de captation calcique, bloquaient totalement la consommation d'oxygène aux doses utilisées et que leur effet inhibiteur disparaissait après addition d'un substrat approprié (succinate - ac. ascorbique, TMPD). Au cours de ce travail, nous avons utilisé l'électrode vibrante de platine.

Les courbes de la figure 33 rendent compte d'expériences réalisées avec la Roténone et le succinate. Le tampon saturé d'oxygène que nous avons utilisé ici est composé de : Tris 0,02 M, KCl 0,125 M, pH 7,4. L'addition de la suspension mitochondriale, entraîne une diminution régulière de la concentration en oxygène du milieu. Cependant, dans ces conditions la respiration n'est assurée que par la présence de substrats endogènes, ce qui explique la faible intensité du phénomène (33 A). Si le tampon renferme de la Roténone 0,67 μ g par ml (33 B), il n'apparaît aucune diminution de la concentration en oxygène du milieu après addition de la suspension mitochondriale. Par contre, en ayant supplémenté le tampon de Roténone 0,67 μ g/ml et de succinate $6,3 \cdot 10^{-3}$ M (33 C), les mitochondries exercent une activité respiratoire identique à celle constatée en l'absence de Roténone.

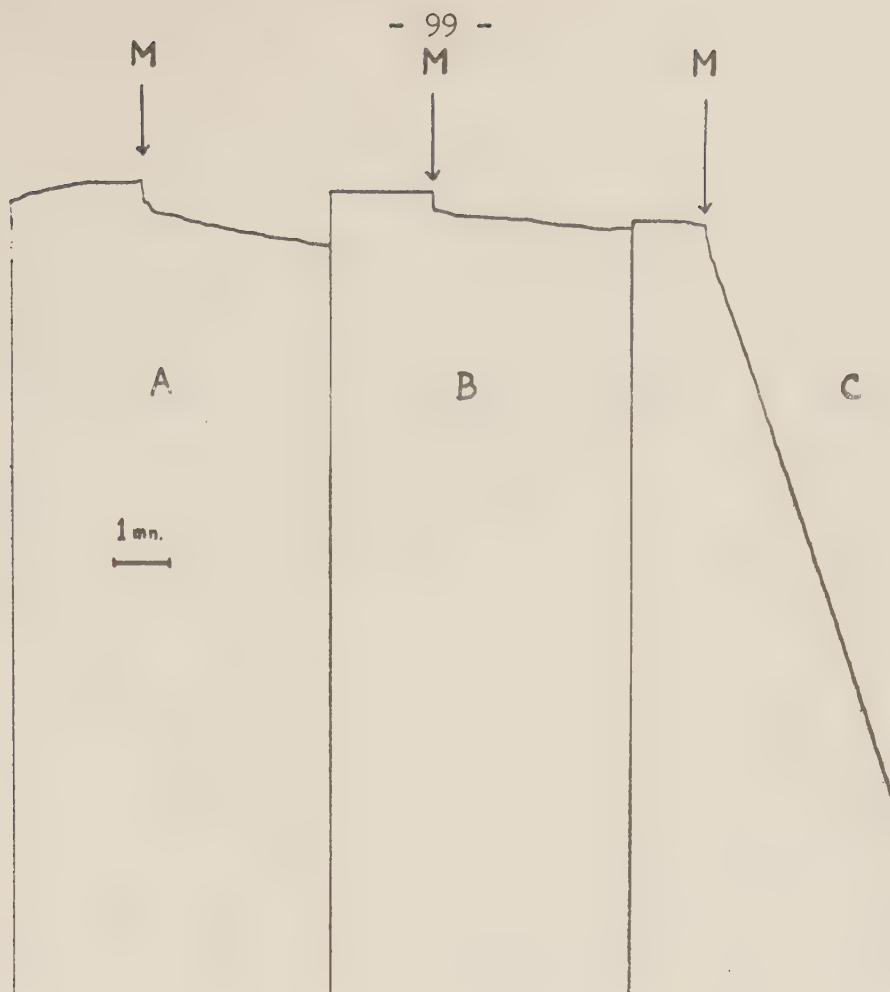


Figure 34 : Effets de l'Antimycine seule ou associée à l'acide Ascorbique-TMPD sur la respiration mitochondriale. Mêmes conditions que celles indiquées sur la figure 33.

A : En l'absence d'Antimycine A

B : En présence d'Antimycine A = 0,1 μ g par mg de protéines

C : En présence d'Antimycine A = 0,1 μ g par mg de protéines,
Acide ascorbique $3 \cdot 10^{-2}$ M et TMPD $3 \cdot 10^{-4}$ M.

La figure 34 a été obtenue au cours d'une expérience analogue, réalisée avec l'Antimycine A et l'acide ascorbique - TMPD. La respiration modérée des mitochondries placées dans le tampon Tris-ClK (34 A) devient pratiquement nulle lorsque celui-ci renferme $0,1 \mu\text{g}$ d'Antimycine A par mg de protéines mitochondriales (34 B). Cependant cette inhibition n'apparaît pas en présence d'acide ascorbique 3.10^{-2} M et de TMPD 3.10^{-4} M, ceux-ci cédant activement leurs électrons au cytochrome c comme l'atteste la diminution extrêmement rapide de la concentration en oxygène du milieu (34 C).

Ces essais permettent donc de nous assurer qu'au cours des expériences précédentes les inhibiteurs respiratoires produisaient effectivement l'effet recherché dans les conditions utilisées. Cependant cette méthode "oxygraphique" ne permet pas d'effectuer des essais avec le cyanure, celui-ci détériorant l'électrode de platine. Dans ce cas particulier, il a été nécessaire de recourir à la méthode manométrique de Warburg.

III - Effets de Ca^{++} seul ou en association avec T_3 ou TA_3 sur la consommation d'oxygène des mitochondries

L'étude de l'influence de Ca^{++} , seul ou associé avec les produits thyroïdiens, sur la respiration mitochondriale a été réalisée en suivant la technique précédemment décrite, à l'aide de l'électrode de Clark. Cependant, il était nécessaire de savoir si le phosphate est indispensable aux effets de Ca^{++} sur la consommation d'oxygène, car actuellement ce problème n'est pas encore tranché. Pour certains auteurs comme CHANCE (35), il est nécessaire que le milieu renferme du phosphate pour que des additions successives de Ca^{++} provoquent une accélération transitoire de la respiration. Pour d'autres, com-

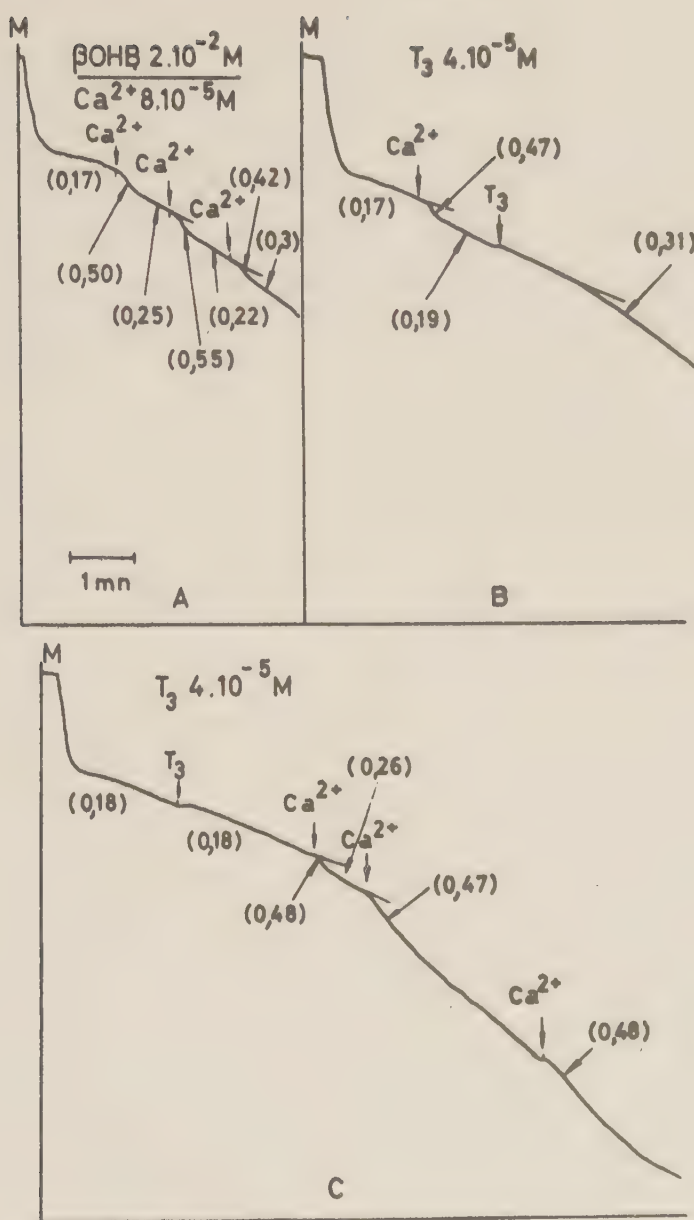


Figure 35 : Enregistrements oxygraphiques des effets de Ca^{2+} et T_3 sur la respiration mitochondriale en présence de β hydroxybutyrate (2.10^{-2} M) comme substrat dans un milieu Tampon Tris-HCl 2.10^{-2} M , NaCl 8.10^{-2} M pH = 7 (Volume final = 2,3 ml)

En M : mitochondries ; entre parenthèses : pente de la courbe expérimentale représentant la vitesse de la consommation de O_2 en $\mu \text{ M}$ par seconde.

A : 3 additions successives et égales de Ca^{2+} (8.10^{-5} M)

B : T_3 (4.10^{-5} M) après Ca^{2+} (8.10^{-5} M)

C : 3 additions de Ca^{2+} (8.10^{-5} M) après T_3 (4.10^{-5} M)

me LEHNINGER (158), la présence de cet anion exerce un effet néfaste sur les manifestations respiratoires de Ca^{++} , inhibant non pas l'activation de la consommation d'oxygène mais au contraire en supprimant le retour à la vitesse initiale. Toutefois en présence de faibles concentrations d'ATP (0,6 mM) ou d'oligomycine, l'effet inhibiteur du phosphate disparaît.

Pour notre part, nous n'avons pas pu reproduire les expériences sur lesquelles CHANCE s'appuie pour conclure à la nécessité du phosphate dans ce mécanisme. Par contre, nous sommes en accord avec les résultats obtenus par LEHNINGER. Il faut cependant remarquer que CHANCE utilise pour ses mesures polarographiques, une électrode vibrante de platine revêtue de collodion, tandis que LEHNINGER comme nous mêmes, utilise l'électrode de Clark, ce qui permet de travailler sur de plus grandes quantités de mitochondries. Nous avons donc été amené à opérer en l'absence de phosphate en utilisant un tampon saturé d'oxygène renfermant $\text{Tris-ClH } 2.10^{-3} \text{ M}$ pH 7,1, $\text{NaCl } 80.10^{-3} \text{ M}$, $\beta\text{-hydroxybutyrate } 2.10^{-3} \text{ M}$. Deux ml de ce tampon sont placés dans la cellule de l'oxygraphe. Après équilibration, on ajoute 0,3 ml de la suspension mitochondriale correspondant à 6 à 8 mg de protéines. Les additions ultérieures des différents produits (Ca^{++} , T_3 , TA_3) s'effectuent sous un faible volume, de 10 à 20 μl , de façon à rendre négligeable l'effet de dilution ; en outre on prend soin de ne les ajouter que lorsque la pente traduisant la respiration mitochondriale est devenue régulière.

1 - Effets d'additions successives de Ca^{++} sur la respiration mitochondriale

La figure 35 A traduit les effets d'additions successives de $\text{Ca}^{++} 8.10^{-5} \text{ M}$. En l'absence du cation, la vitesse res-

piratoire faible mais régulière est de $0,17 \mu\text{M O}_2$ par seconde. L'addition de doses successives de Ca^{++} provoque une augmentation rapide (passage de $0,17$ à $0,50$ $0,55$ et $0,42 \mu\text{M O}_2$ par seconde) mais transitoire de la respiration, la durée de l'activation étant chaque fois sensiblement constante. Un tel résultat est parfaitement conforme à ceux obtenus par LEHNINGER.

2 - Effets d'additions successives de Ca^{++} en présence de T_3 sur la respiration mitochondriale

Au cours de ces expériences, nous avons recherché si T_3 modifiait l'effet de Ca^{++} sur la consommation d'oxygène. Nous avons fait pour cela différents essais au cours desquels l'addition de T_3 précédait ou suivait celle du cation.

La figure 35 C a été obtenue lors d'un essai effectué en ajoutant T_3 à la concentration de 4.10^{-5} M, 2 minutes avant Ca^{++} 8.10^{-5} M. L'addition de T_3 à cette concentration ne provoque pas de modification de la vitesse respiratoire qui se maintient à $0,18 \mu\text{M O}_2$ par seconde. Une élévation immédiate et temporaire de la consommation d'oxygène ($0,48 \mu\text{M}$ par seconde) se manifeste normalement dès l'addition de Ca^{++} . Mais si on ajoute une nouvelle dose de Ca^{++} , l'activation obtenue persiste sans retour à l'état initial et ne peut être modifiée par une troisième addition. La figure 35 B rapporte le résultat d'une expérience identique à la précédente, mais réalisée en ajoutant T_3 4.10^{-5} M après Ca^{++} , lorsque la respiration est revenue à sa vitesse initiale. On constate alors que sous l'effet de T_3 la consommation d'oxygène passe, après un temps de latence d'une minute environ, de $0,19$ à $0,31 \mu\text{M}$ par seconde. Cette augmentation de la vitesse respiratoire est lente à s'établir, mais se maintient de façon permanente sans retour à l'état initial.

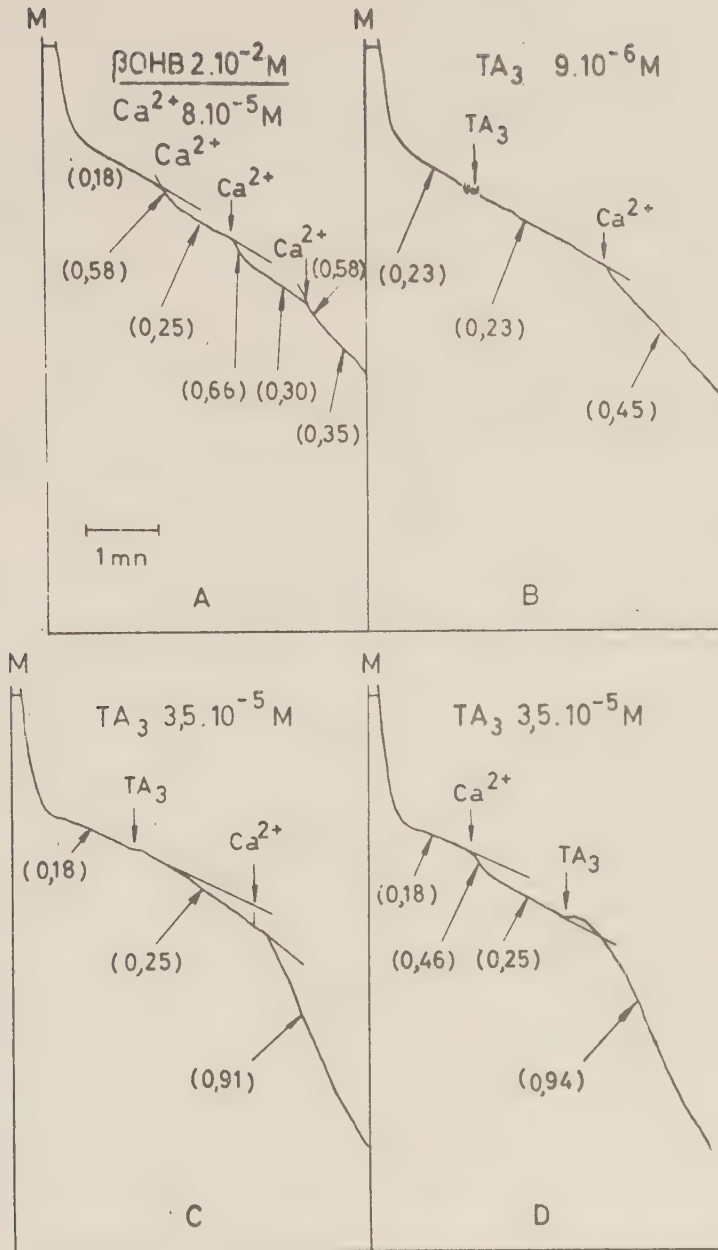


Figure 36 : Enregistrements oxygraphiques des effets de Ca^{2+} et $\text{T}_{\text{A}3}$ sur la respiration mitochondriale en présence de β hydroxybutyrate. Mêmes conditions que celles de la figure 35.

- A : 3 additions successives et égales de Ca^{2+} (8.10^{-5} M)
- B : Ca^{2+} (8.10^{-5} M) après $\text{T}_{\text{A}3}$ (9.10^{-6} M)
- C : Ca^{2+} (8.10^{-5} M) après $\text{T}_{\text{A}3}$ ($3,5.10^{-5} \text{ M}$)
- D : $\text{T}_{\text{A}3}$ ($3,5.10^{-5} \text{ M}$) après Ca^{2+} (8.10^{-5} M)

Ainsi, cette expérience fait apparaître qu'une dose de T_3 trop minime pour produire à elle seule une activation de la respiration, peut, associée à une faible concentration de Ca^{++} , entraîner une augmentation continue de la consommation d'oxygène.

3 - Effets d'additions successives de Ca^{++} , en présence de TA_3 sur la respiration mitochondriale

Ces expériences ont été répétées en remplaçant T_3 par TA_3 . Les résultats obtenus sont rapportés sur la figure 36. L'addition successive de Ca^{++} 8.10^{-5} M (36 A) entraîne comme précédemment une activation temporaire de la consommation d'oxygène. Par contre (36 B) l'intensité respiratoire reste toujours élevée ($0,45 \mu M$ par seconde) quand Ca^{++} est ajouté après TA_3 9.10^{-6} M. Cette concentration en TA_3 est trop faible pour produire à elle seule une accélération de la respiration, en effet, la consommation d'oxygène est de $0,23 \mu M$ /seconde avant comme après l'addition du produit iodé, mais elle devient suffisante pour rendre irréversible l'activation respiratoire produite par Ca^{++} . Les essais suivants ont été effectués en utilisant une dose plus élevée : $3,5.10^{-5}$ M. A cette concentration TA_3 produit à lui seul une nette augmentation de l'intensité respiratoire qui passe de $0,18$ à $0,25 \mu M O_2$ /seconde (36 C). Si dans ces conditions on ajoute Ca^{++} , 2 minutes après TA_3 , l'activation due au cation devient considérable puisqu'elle atteint $0,91 \mu M O_2$ /seconde. Une vitesse aussi élevée est obtenue ($0,94 \mu M O_2$ /seconde) lorsque inversement l'addition de Ca^{++} précède celle de TA_3 (36 D).

Tous ces résultats ont été obtenus en utilisant le β -hydroxybutyrate comme substrat hydrogéné. Nous avons refait

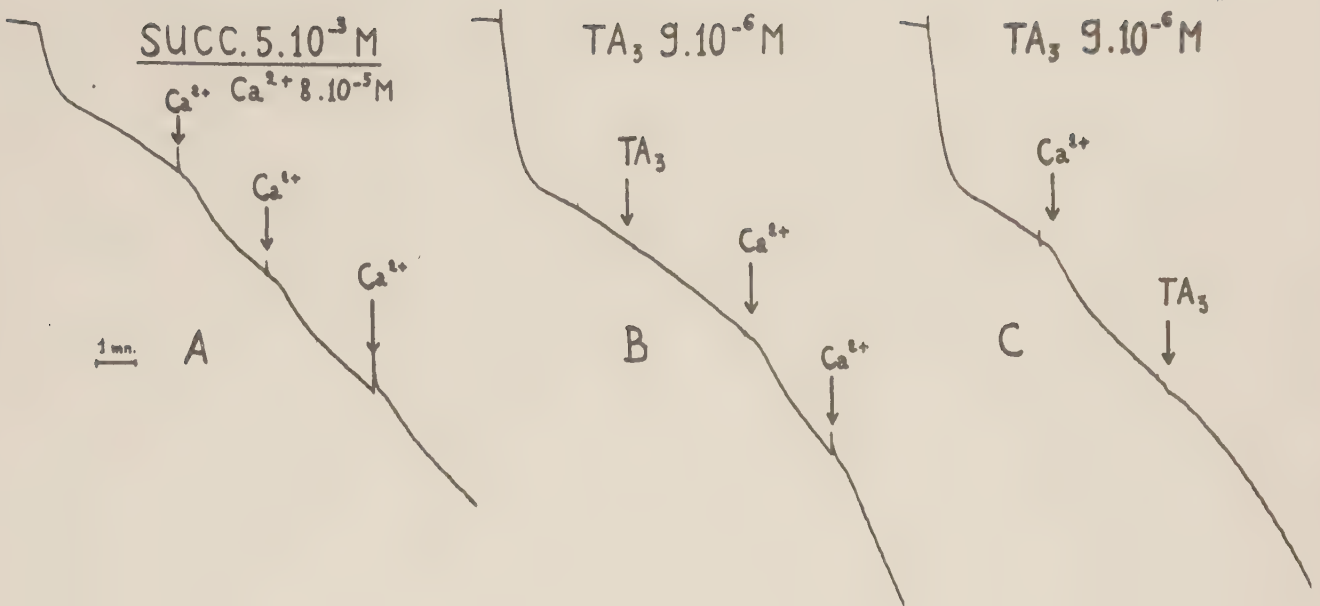


Figure 37 : Enregistrements oxygraphiques des effets de Ca^{2+} et TA_3 sur la respiration mitochondriale en présence de succinate $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Mêmes conditions que celles indiquées sur la figure 36.

A : 3 additions successives et égales de Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)

B : 2 additions successives de Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$)
après TA_3 ($9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$)

C : TA_3 ($9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) après Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} \text{ m}$)

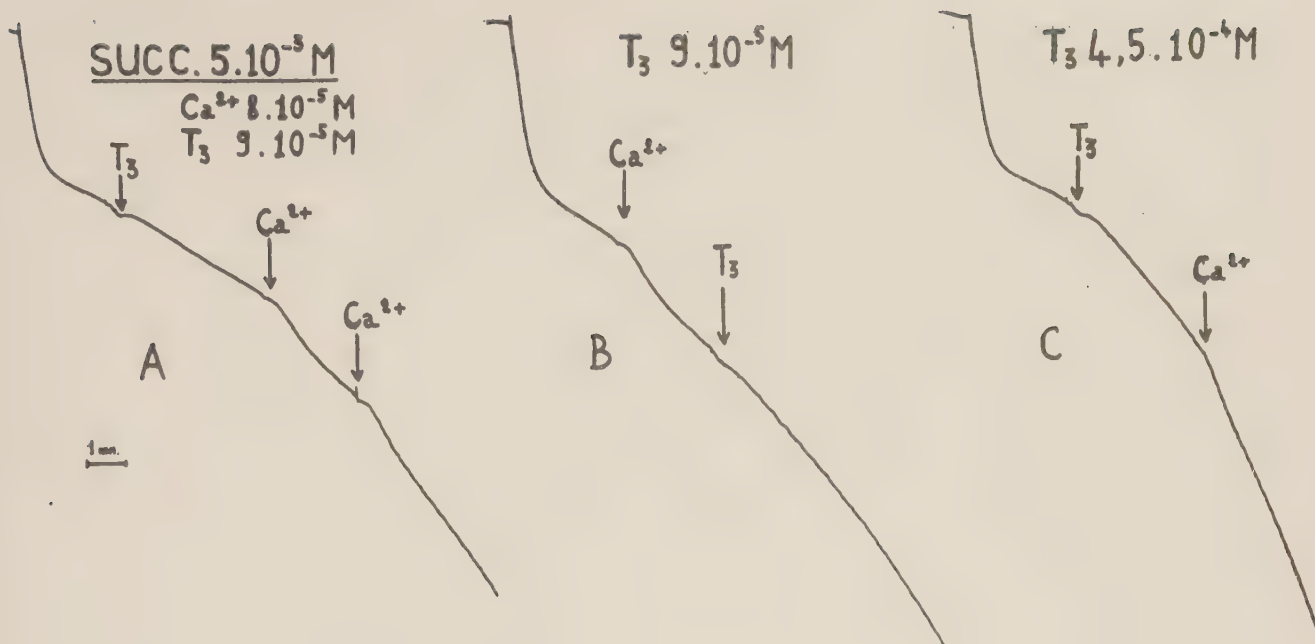


Figure 38 : Enregistrements oxygraphiques des effets de Ca^{2+} et T_3 sur la respiration mitochondriale en présence de succinate $5 \cdot 10^{-3} M$. Mêmes conditions que celles indiquées sur la figure 36.

A : 2 additions successives de Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} M$) après T_3 ($9 \cdot 10^{-5} M$)

B : T_3 ($9 \cdot 10^{-5} M$) après Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} M$)

C : Ca^{2+} ($8 \cdot 10^{-5} M$) après T_3 ($9 \cdot 10^{-5} M$)

tous ces essais avec le succinate $6,3.10^{-3}$ M ajouté au même tampon que précédemment. Les résultats obtenus sont dans tous les cas identiques à ceux obtenus avec le β -hydroxybutyrate, comme l'attestent les figures 37 et 38.

Ainsi ces expériences font apparaître que T_3 et TA_3 modifient considérablement les réponses respiratoires de Ca^{++} , le substrat hydrogéné étant le β -OH-B ou le succinate. Ces deux produits hormonaux suppriment le caractère transitoire de l'activation respiratoire du cation qui manifeste alors son influence de façon continue. En outre cet effet des produits iodés apparaît avec des doses trop faibles, pour que ceux-ci exercent par eux-mêmes une augmentation de la consommation d'oxygène "in vitro", si bien que l'on peut considérer inversement que Ca^{++} permet à de faibles concentrations d'hormones thyroïdiennes de manifester leur effet respiratoire. Enfin, cet effet réciproque des produits iodés et de Ca^{++} , qui se traduit toujours par une augmentation irréversible de la consommation d'oxygène, apparaît indifféremment, que le cation soit ajouté à la suspension mitochondriale avant ou après le produit iodé.

DEUXIEME CHAPITRE

--

EFFETS DE Ca^{++} SEUL OU EN ASSOCIATION AVEC T_3
OU TA_3 SUR L'ETAT D'OXYDOREDUCTION DU
NICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE (NAD)

--

I - Conditions expérimentales

Les transporteurs de la chaîne respiratoire présentent un spectre d'absorption différent suivant qu'ils se trouvent à l'état oxydé ou à l'état réduit. La figure 39 donnée à titre d'exemple, représente le spectre différentiel entre 400 et 600 $\text{m}\mu$ d'une suspension de mitochondries de coeur de pigeon. Ces courbes traduisent les différences de densité optique de la préparation en anaérobiose et en aérobie, mesurées à la température de l'azote liquide. Les différents pics correspondent aux diverses bandes d'absorption des cytochromes. Quant aux formes réduites et oxydées du NAD, elles présentent également une absorption différente entre 300 et 400 $\text{m}\mu$ comme en témoigne la figure 40.

Lorsque un composé possède un tel spectre différentiel, suivant qu'il est à l'état oxydé ou à l'état réduit, il est possible de suivre le changement d'une forme en l'autre à l'aide de méthodes spectrophotométriques. En effet, considérons les spectres d'absorption du cytochrome c réduit et oxydé (figure 41), la forme réduite présente un maximum à 550 $\text{m}\mu$ et les deux courbes se coupent en un point "isobestique" à 541 $\text{m}\mu$. A cette longueur d'onde, et pour une concentration déterminée de cytochrome c, la valeur de la densité optique

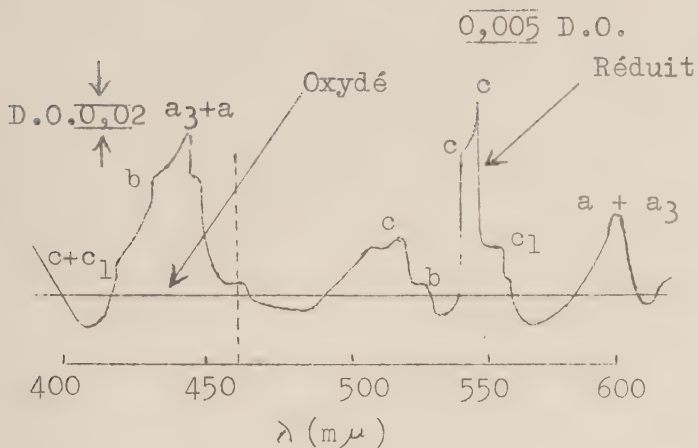


Figure 39 : spectre différentiel d'une suspension de mitochondries de coeur de pigeon en aérobiose et en anaérobiose, mesuré à la température de l'azote liquide

Figure 40 : Spectre d'absorption des formes oxydées (—) et réduites (---) du NAD.

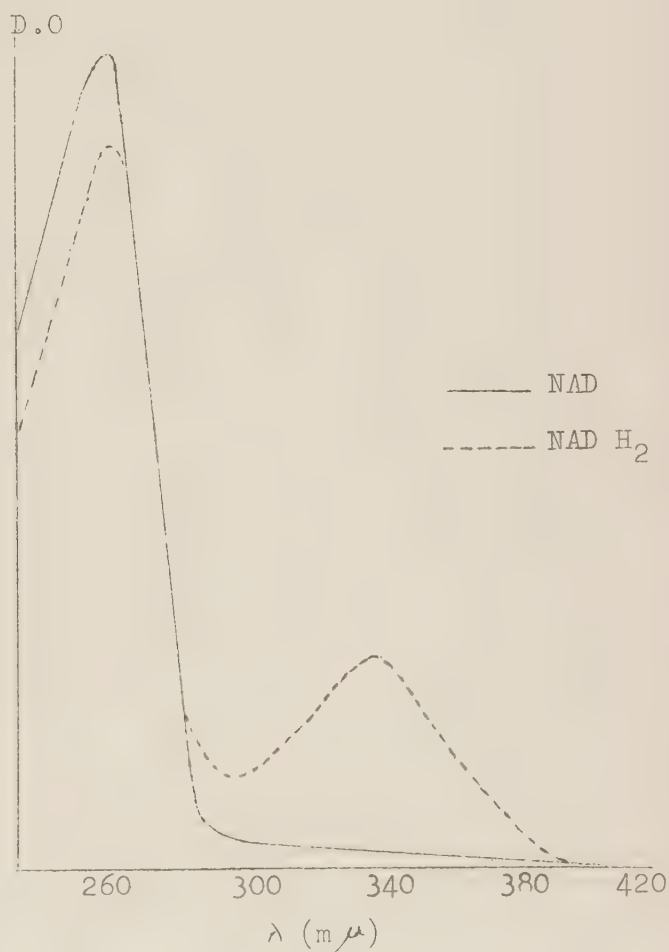
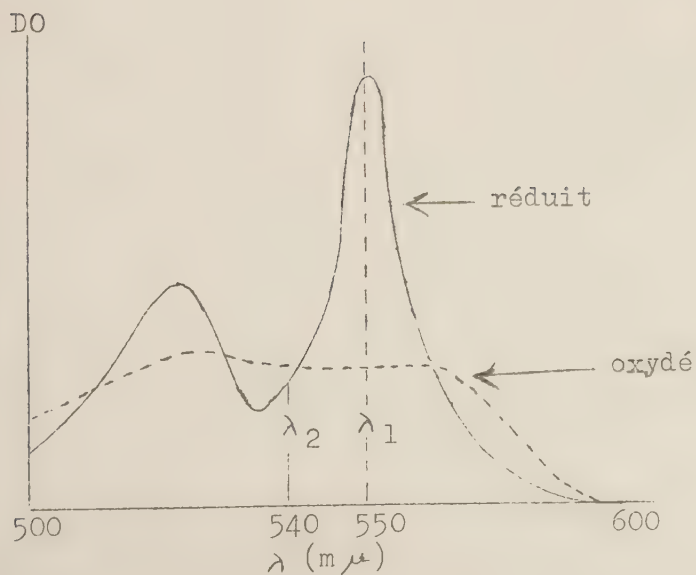


Figure 41 : Spectre d'absorption des formes oxydées (---) et réduites (—) du cytochrome C.

sera constante quel que soit l'état d'oxydoréduction du transporteur. Par contre, la différence des densités optiques mesurées à 550 et 541 m μ est sensiblement proportionnelle au pourcentage de cytochrome c réduit.

Nous avons utilisé pour suivre la cinétique d'oxydation ou de réduction des transporteurs de la chaîne respiratoire, un spectrophotomètre à double faisceau et à double longueur d'onde (Aminco-Chance) associé au dispositif d'enregistrement Varian XY. Cet appareil mis au point par CHANCE (27, 28, 29, 33) permet d'enregistrer en fonction du temps la différence de densité optique d'une solution ou d'une suspension, à deux longueurs d'onde différentes. L'avantage essentiel de cet appareil réside dans sa très grande sensibilité mettant en évidence des variations d'absorption de 0,002 à 0,02 unité de densité optique, ce qui pour des substances ayant un coefficient d'extinction modéré correspond à des concentrations micromoléculaires. En outre ces très faibles variations peuvent être enregistrées dans un milieu possédant une densité optique initiale de 2 à 3, ne transmettant donc que 0,1 à 1 % de la lumière incidente. Une telle sensibilité est indispensable pour effectuer les mesures sur les suspensions mitochondriales dont la turbidité est très forte.

Cet appareil extrêmement complexe est constitué essentiellement de deux monochromateurs permettant de séparer à partir d'une lumière émise par une lampe de tungstène ou à vapeur de mercure, deux faisceaux lumineux de longueur d'onde

λ_1 et λ_2 . Une roue perforée tournant à une vitesse régulière permet à chacun de ces faisceaux de traverser alternativement à la fréquence de 50 fois par seconde une cuve en quartz, thermostatée, contenant la suspension mitochondriale. La lumière

transmise est ensuite reçue par un photomultiplicateur relié par un dispositif électronique au système d'enregistrement qui traduit en continu la différence d'absorption des deux faisceaux lumineux. En outre un oscilloscope permet au début de chaque essai d'équilibrer les deux faisceaux incidents, ce qui élimine ultérieurement les variations d'intensité de la source lumineuse ainsi que les changements néphélométriques de la suspension mitochondriale.

Nous avons préféré étudier les effets de Ca^{++} et des produits iodés sur l'état d'oxydoréduction du NAD plutôt que sur celui des cytochromes. En effet, ces derniers se trouvent presque complètement à l'état oxydé (environ 90 % pour le cytochrome c) lorsque les mitochondries respirent ; il est dès lors difficile d'étudier tout effet se traduisant par une oxydation. Par contre le NAD, dans ces conditions, se trouve être environ à 50 % sous forme réduite ; ce coenzyme présente en outre un spectre différentiel assez large alors que les bandes d'absorption des cytochromes sont extrêmement fines, ce qui rend très délicat les réglages du dispositif optique du spectrophotomètre. Dans le cas du NAD, il convient d'opérer pour la mesure à une longueur d'onde à $350 \text{ m}\mu$, celle de référence étant de $388 \text{ m}\mu$.

Le dispositif optique ayant été réglé, on place dans la cuve du spectrophotomètre 3 ml de tampon préalablement saturé d'oxygène. On ajoute un volume variable de la suspension mitochondriale renfermant 5 à 10 mg de protéines selon la teneur en NAD. On homogénéise soigneusement à l'aide d'un agitateur vibrant, et la plume de l'enregistreur étant placée au milieu de la feuille de papier, on équilibre à l'aide de l'oscilloscope les deux faisceaux lumineux. Le dispositif électro-

nique est ajusté de façon à obtenir la plus grande sensibilité compatible avec un bruit de fond modéré. Enfin, le système d'enregistrement est mis en marche. Les additions des divers réactifs en cours d'expérience ont lieu sous un faible volume ne dépassant pas 25 μ l afin de rendre négligeable la dilution.

Le tracé rapporté sur la figure 42 à titre d'exemple représente l'état d'oxydoréduction du NAD dans les différents états respiratoires définis par CHANCE. Cette expérience a été réalisée à 20°C dans un tampon saturé d'oxygène ayant la composition suivante : PO_4HNa_2 4.10^{-3} M, Tris-ClH 5.10^{-3} M pH = 7, ClNa 8.10^{-2} M, Cl_2Mg 10^{-2} M. Les mitochondries (5 mg de protéines) ont été ajoutées à 3 ml de cette solution tampon placée dans la cuve du spectrophotomètre. Les particules se trouvent alors dans l'état 1 caractérisé par la seule présence des substrats hydrogénés et des accepteurs de phosphate endogènes. Le NAD se trouve environ à 75 % sous forme réduite, et évolue lentement vers la forme oxydée. L'addition de malonate $6,6.10^{-3}$ M provoque une nette oxydation du coenzyme, consécutive à l'inhibition de la succinodeshydrogénase. Si on ajoute ensuite de l'ADP, on réalise les conditions définissant l'état 2 : excès d'ADP, et substrats hydrogénés limités aux substrats endogènes. Dans cet état, le NAD évolue rapidement vers une oxydation totale. L'addition d'un substrat (glutamate-malate) réalise alors les conditions de l'état 3 (ADP et substrats exogènes en excès) entraînant une réduction partielle du NAD. Celui-ci se maintient dans cet état d'équilibre tant qu'il persiste un excès d'ADP dans le milieu. Lorsque le nucléotide a été entièrement transformé par phosphorylation en ATP, une faible réduction apparaît ; ce nouveau niveau thermodynamique correspond à l'état 4 de CHANCE (excès de substrat exogène) et se maintient tant que persiste l'aérobiose. Lorsque tout

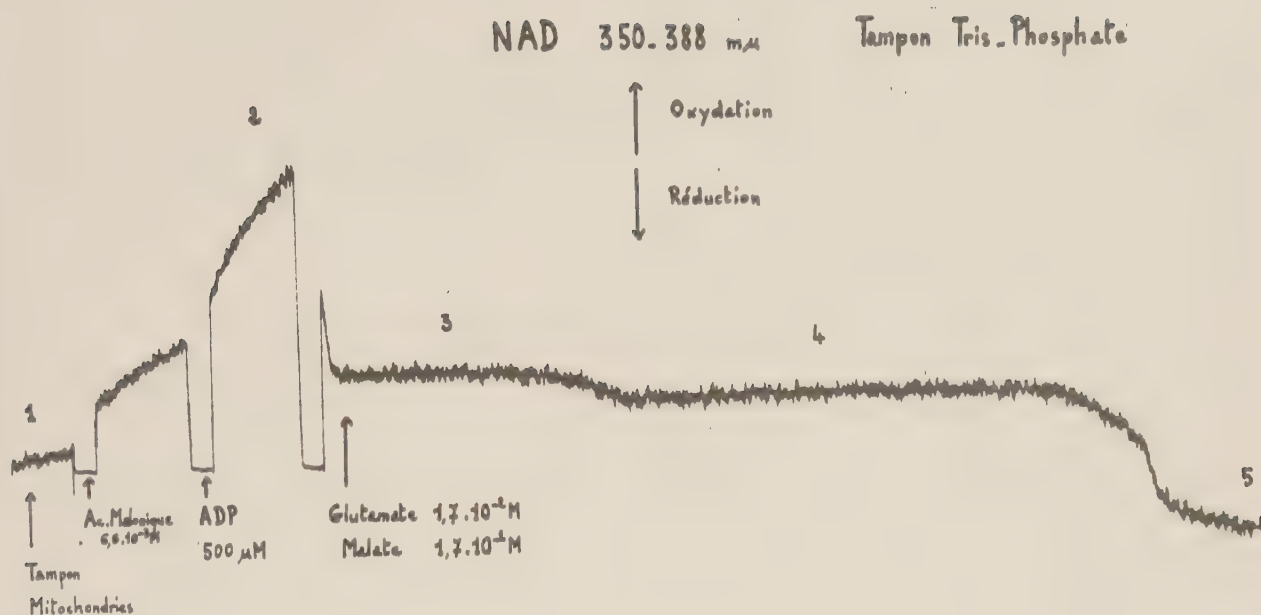


Figure 42 : Enregistrement spectrophotométrique à deux longueurs d'ondes ($\lambda_1 = 350 \text{ m}\mu$; $\lambda_2 = 388 \text{ m}\mu$) d'une suspension mitochondriale dans les différents états respiratoires définis par CHANCE.

Les mitochondries (5 mg de protéines) sont ajoutées à 3 ml d'un tampon = Na_2HPO_4 4.10^{-3} M ; Tris ClH 5.10^{-3} M pH 7,0 ;

NaCl 8.10^{-2} M ; MgCl_2 10^{-2} M .

température : 20°C .

Etat 1 : Mitochondries en l'absence de substrats exogènes et d'ADP.

Etat 2 : Présence d'ADP en excès. Absence de substrats exogènes.
Le coenzyme s'oxyde à 100 %.

Etat 3 : Présence simultanée d'ADP et de substrats exogènes.

Etat 4 : Présence de substrats exogènes. Absence d'ADP.

Etat 5 : Anaérobiose. Le coenzyme est réduit à 100 %.

NAD λ_1 350 - λ_2 388 m μ

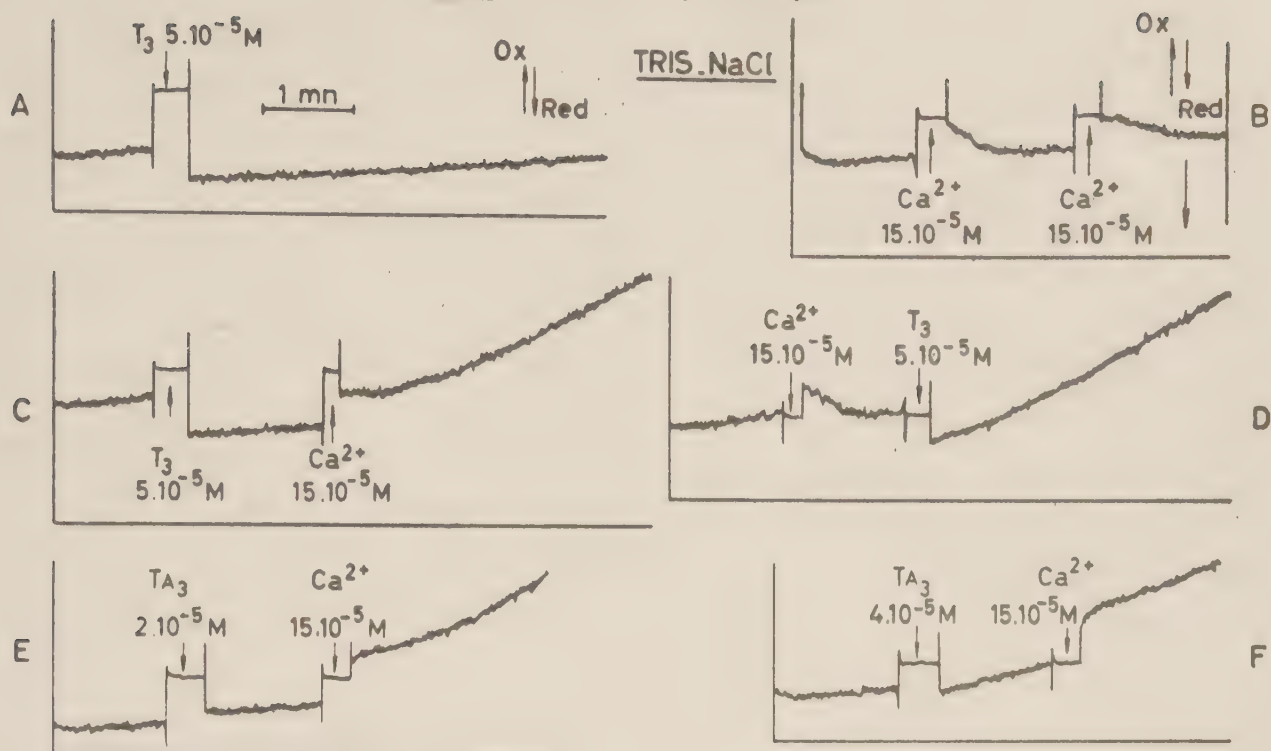


Figure 43 : Enregistrements spectrophotométriques à deux longueurs d'ondes ($\lambda_1 = 350$ m μ ; $\lambda_2 = 388$ m μ) des effets de T_3 ou T_{A3} et Ca^{2+} sur l'état d'oxydo-réduction du NAD. Milieu Tris-NaCl sans phosphate (voir conditions expérimentales dans le texte). Sens de l'oxydation (Ox) et de la réduction (Red) indiqués par les flèches.

- | | |
|--|--|
| A : T_3 seul (5.10^{-5} M) | B : 2 additions successives et égales de Ca^{2+} (15.10^{-5} M) |
| C : T_3 (5.10^{-5} M) suivi de Ca^{2+} (15.10^{-5} M) | D : Ca^{2+} (15.10^{-5} M) suivi de T_3 (5.10^{-5} M) |
| E : T_{A3} (2.10^{-5} M) suivi de Ca^{2+} (15.10^{-5} M) | F : T_{A3} (4.10^{-5} M) suivi de Ca^{2+} (15.10^{-5} M) |

l'oxygène du milieu a été consommé, le NAD évolue vers une réduction totale correspondant à l'état 5. Ce tracé permet d'étalonner l'appareil, le 100 % de forme réduite correspondant à l'état 5, tandis que le 100 % de forme oxydée est atteint lorsque l'état 2 est stabilisé.

La mise au point de l'appareillage étant réalisée, nous avons étudié les effets de Ca^{++} sur l'état d'oxydoréduction du NAD et recherché s'ils étaient modifiés par T_3 et TA_3 . Ce travail a été réalisé d'une part en l'absence de phosphate, condition dans laquelle la captation de Ca^{++} par les mitochondries est limitée et d'autre part dans les conditions optimales de fixation, c'est-à-dire en présence de phosphate et d'ATP.

II - Essais réalisés en milieu non phosphaté

Les essais réalisés en l'absence de phosphate sont conduits dans un milieu saturé d'oxygène dont la composition est la suivante : mitochondries (8 à 10 mg de protéines), Tris-ClH $1,7 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7,0, ClNa $8 \cdot 10^{-2}$ M, glutamate $1,7 \cdot 10^{-2}$ M, malate $1,7 \cdot 10^{-2}$ M, malonate $6,6 \cdot 10^{-3}$ M, saccharose $3,3 \cdot 10^{-2}$ M. Le volume final est de 3 ml et la température de 20°C. La figure 43 rend compte des résultats obtenus. L'addition de T_3 à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M ne provoque aucun changement dans l'état d'oxydoréduction du NAD (43 A). Par contre, après Ca^{++} $15 \cdot 10^{-5}$ M, on constate une oxydation brutale du coenzyme qui ne tarde pas cependant à revenir à son état initial. Cette oxydation cyclique apparaît de nouveau à la suite d'une nouvelle addition du cation (43 B). Si l'on ajoute Ca^{++} alors que le milieu renferme déjà T_3 , le NAD subit également une oxydation, mais elle ne fait que s'intensifier pour devenir totale sans retour à l'état initial (43 C). Inversement, des essais ont été

réalisés en ajoutant Ca^{++} avant T_3 (43 D). Ca^{++} produit son effet habituel, mais T_3 provoque alors une oxydation continue du coenzyme. Ainsi en présence d'une faible concentration de Ca^{++} , l'addition de T_3 provoque une oxydation du NAD qui ne serait pas apparue en l'absence du cation.

Des essais ont également été effectués avec TA_3 . A la concentration de 4.10^{-5} M celui-ci provoque déjà par lui-même une oxydation régulière du coenzyme ; dans ces conditions l'addition de Ca^{++} entraîne une brusque accélération du phénomène sans retour à l'état initial (43 F). Avec une dose plus faible de TA_3 (2.10^{-5} M) aucun changement dans l'état d'oxydo-réduction du NAD n'apparaît, cependant cette dose est suffisante pour rendre irréversible l'oxydation consécutive à l'addition de Ca^{++} (43 E).

Ainsi la présence dans le milieu d'incubation de Ca^{++} et de T_3 ou TA_3 , à des concentrations ne provoquant qu'un effet transitoire pour les uns et nul pour les autres, provoque une oxydation continue du NAD.

III - Essais réalisés en milieu phosphaté

Les essais en milieu phosphaté ont été réalisés dans un milieu identique à celui utilisé pour les expériences de captation de Ca^{++} . Cependant il a été nécessaire d'y ajouter de l'oligomycine afin d'inhiber l'effet ATPasique de T_3 , TA_3 et Ca^{++} . En effet, la libération d'ADP à partir de l'ATP présent dans le milieu, produirait une modification de l'état d'oxydoréduction du NAD consécutive au changement d'état respiratoire des mitochondries. En outre, la présence d'oligomycine ne peut perturber le phénomène étudié, cet antibiotique ne s'opposant pas à la captation particulière de Ca^{++} par la

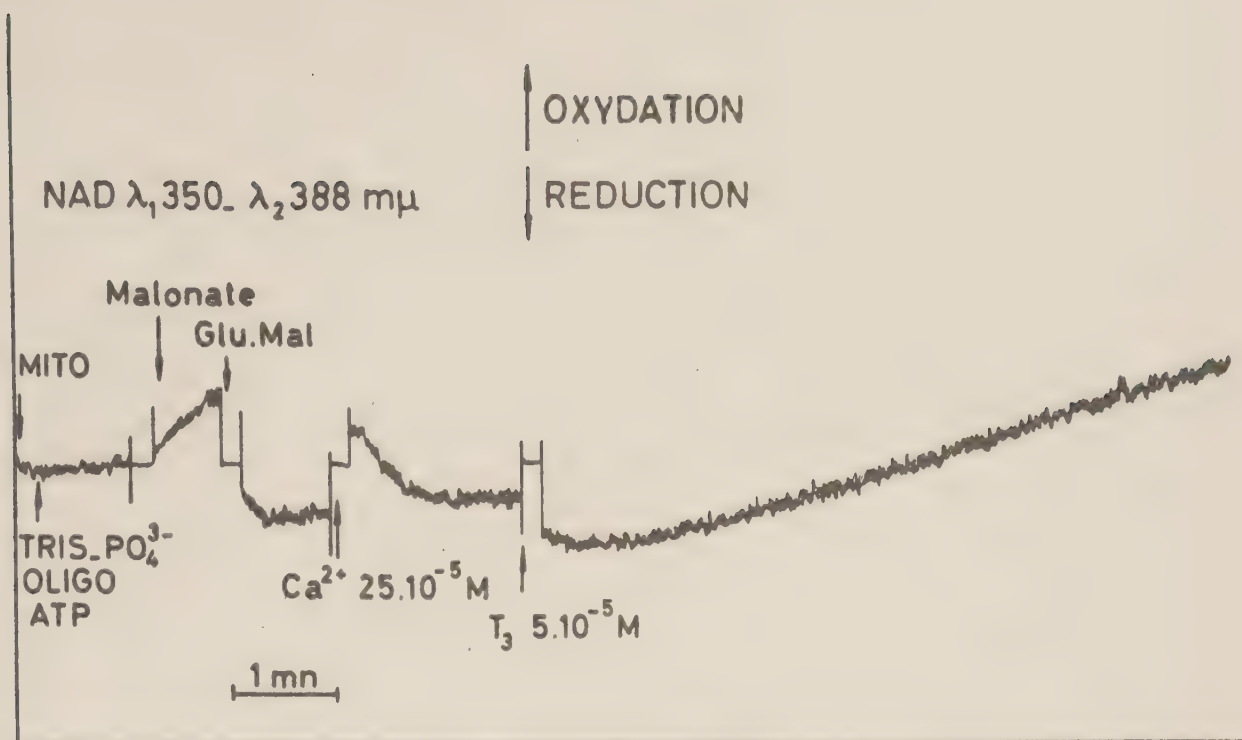


Figure 44 : Enregistrement spectrophotométrique à deux longueurs d'ondes ($\lambda_1 = 350 \text{ m}\mu$; $\lambda_2 = 388 \text{ m}\mu$) des effets de Ca^{2+} ($25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) et T_3 ($5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) sur l'état d'oxydo-réduction du NAD dans un milieu renfermant du phosphate et de l'oligomycine (voir texte), T_3 étant ajouté après Ca^{2+} .

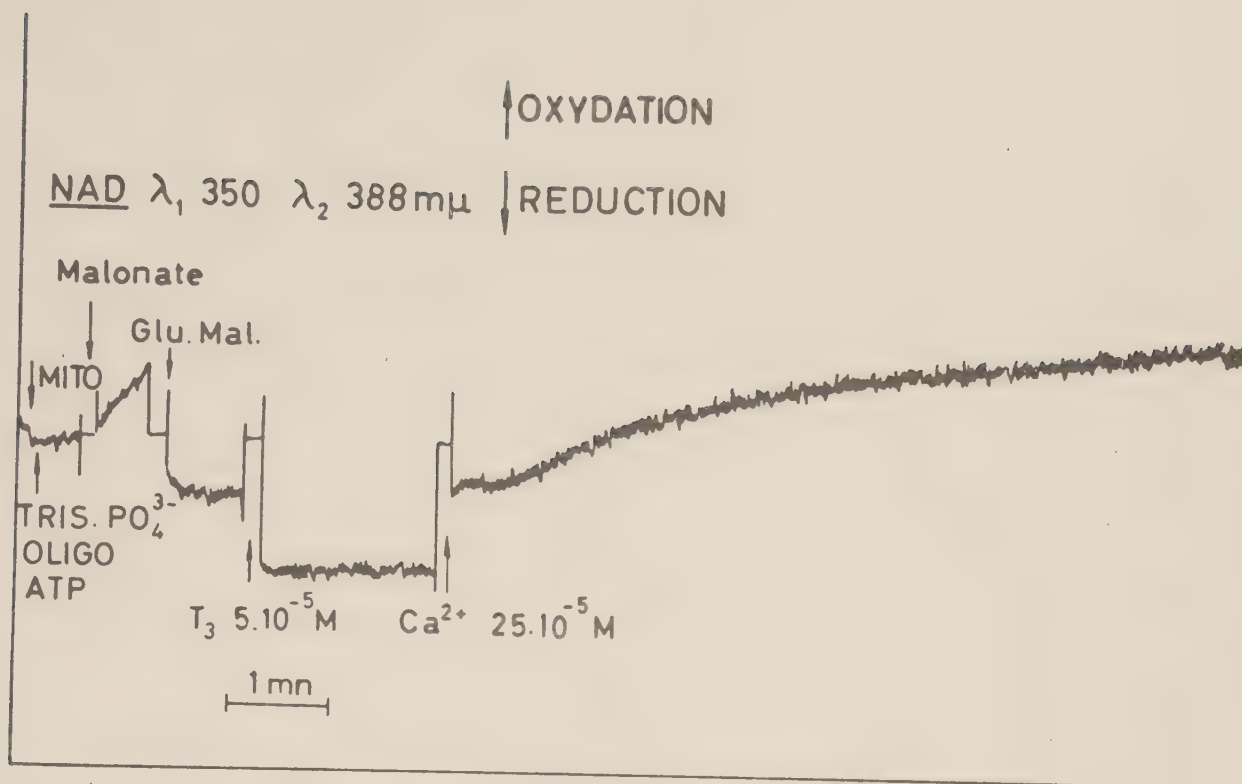


Figure 45 : M $\hat{e}$ me exp $\acute{e}$ rience que celle repr $\acute{e}$ sent $\acute{e}$ e sur la figure 44, mais T_3 est ajout $\acute{e}$ avant Ca^{2+} .

voie respiratoire.

La composition du milieu est donc la suivante :
 PO_4HNa_2 4.10^{-3} , Tris-ClH 5.10^{-3} M pH 7,0, ClNa 8.10^{-2} M, Cl_2Mg 10^{-2} M, ATP 3.10^{-3} M, L-glutamate $1,7.10^{-2}$ M, malate $1,7.10^{-2}$ M, malonate $6,6.10^{-3}$ M, oligomycine 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines mitochondriales. Les mitochondries (4 à 5 mg de protéines) sont ajoutées à 3 ml de tampon placés dans la cuve du spectrophotomètre thermostatée à 20°C.

Dans ces conditions, l'addition de Ca^{++} 25.10^{-5} M entraîne également une oxydation temporaire du NAD (figure 44). Si l'on ajoute T_3 5.10^{-5} M lorsque le coenzyme est revenu à son état initial, ce dernier subit alors une oxydation régulière irréversible. Par contre, en l'absence de Ca^{++} dans le milieu, l'addition de T_3 à même concentration ne modifie pas sensiblement l'évolution de l'état d'oxydoréduction du NAD (figure 45). Ce n'est qu'après avoir ajouté le cation que l'on observe une oxydation continue, allant jusqu'à son terme ultime.

Ces résultats sont donc analogues à ceux des essais poursuivis en l'absence de phosphate. Dans un cas comme dans l'autre, les produits thyroïdiens étudiés, suppriment le caractère cyclique de l'oxydation du NAD sous l'effet de faibles doses de Ca^{++} . En outre, quel que soit l'ordre d'addition des produits halogénés et du cation, on constate une évolution régulière du coenzyme vers sa forme oxydée, alors que ces corps n'exercent chacun de leur côté qu'un effet nul ou transitoire.

DISCUSSION

-:-

Les effets de Ca^{++} associé aux produits thyroïdiens sur l'état d'oxydoréduction du NAD sont complètement superposables à ceux observés sur la consommation d'oxygène des mitochondries. Cette double action du cation correspond vraisemblablement à deux manifestations différentes d'un même phénomène. Il apparaît que l'ion Ca^{++} provoque une activation de la respiration et une oxydation du NAD qui se maintient tant que dure la fixation particulière de Ca^{++} (158). Il semble donc que ces réponses soient liées dans tous les cas au Ca^{++} libre et que les ~~elles~~ disparaissent lorsque celui-ci a été capté par les mitochondries. Or T_3 et TA_3 , suivant que leur addition au milieu d'incubation précède ou suit celle de Ca^{++} , empêchent toute captation du cation ou bien le chassent de ses sites de stockage. Dans un cas comme dans l'autre, les produits thyroïdiens tendent à maintenir Ca^{++} libre et à rendre ainsi durable ses effets sur la respiration mitochondriale et sur l'état d'oxydoréduction du NAD. Dans ces conditions, Ca^{++} se comporte comme un agent découplant puisqu'il amène une augmentation régulière de la consommation d'oxygène et une oxydation continue du NAD. Ce fait mérite d'être rapproché de l'action de fortes doses de cation, l'excès non fixé se comportant comme le 2-4-dinitrophénol.

Cette augmentation réciproque de l'activité de Ca^{++} et des produits thyroïdiens, nous conduit de nouveau à leur admettre un site d'action commun que nous avons montré être l'étape de couplage $\text{X} \sim \text{I}$ (schéma E). Il semble donc qu'il y

ait compétition entre Ca^{++} et les produits hormonaux vis-à-vis de cet intermédiaire. Il se formerait dans les crêtes au cours de la captation du cation un complexe $(\text{X} \sim \text{I}) \text{Ca}_2$ précédant l'étape de précipitation intramitochondriale d'hydroxyapatite. Les produits thyroïdiens produiraient sans doute, la scission de ce complexe libérant Ca^{++} . X et I reformeraient alors le complexe $\text{X} \sim \text{I}$ en utilisant l'énergie respiratoire, ce qui explique l'augmentation de la consommation d'oxygène accompagnée de l'oxydation du NAD. Dès lors on conçoit que Ca^{++} ne pouvant s'accumuler dans les espaces intramitochondriaux, entretienne un cycle de décomposition et de régénération du complexe $\text{X} \sim \text{I}$ se traduisant par une augmentation continue de l'activité respiratoire des mitochondries, comme s'il avait été ajouté à une dose supérieure aux capacités de fixation particulière. Ainsi, des concentrations en produits thyroïdiens, trop faibles pour produire un effet à elles seules, entraînent, associées à de faibles doses de Ca^{++} , une augmentation régulière de la consommation d'oxygène.

CONCLUSION GENERALE

-:-

L'ensemble de notre travail fait apparaître un certain nombre d'analogies et de différences entre les effets mitochondriaux de Ca^{++} et des produits thyroïdiens. Tous les deux provoquent, par un mécanisme étroitement lié aux phosphorylations oxydatives, le gonflement des mitochondries hépatiques fraîchement préparées ; le phénomène supprimé par les inhibiteurs respiratoires ainsi que par le DNP, est insensible à l'action de l'oligomycine et de la rutamycine lesquelles bloquent la synthèse de l'ATP au niveau de la prise du phosphate.

Toutefois, pour produire un effet quantitativement semblable, il est nécessaire de mettre en jeu des concentrations en Ca^{++} environ 300 fois supérieures à celles de T_4 . En outre, si l'activité des composés thyromimétiques sur la morphologie mitochondriale est liée préférentiellement à la deuxième phosphorylation P_2 , il suffit, pour que Ca^{++} exerce son action, que l'une d'entre elles soit conservée quelle que soit la région où a lieu le couplage.

Cependant nous avons mis en évidence au niveau particulier, un antagonisme des produits thyroïdiens vis-à-vis de Ca^{++} . Ainsi les hormones s'opposent à la captation du cation par les mitochondries aussi bien par la voie respiratoire que par la voie ATPasique, que le milieu soit phosphaté ou non. Cet effet ne peut être attribué ni à la formation d'un complexe

insoluble entre le cation et les produits hormonaux puisque ceux-ci agissent à des concentrations plus de deux cents fois inférieures à celles de Ca^{++} , ni à la présence d'iodure provenant d'une deshalogénéation des produits iodés puisque IK à la même concentration se montre inefficace. En fait, l'inhibition de la fixation calcique par les hormones iodées est une conséquence de l'influence de ces produits sur les intermédiaires énergétiques des phosphorylations oxydatives, et nous avons confirmé à nouveau que cette action n'a lieu que si la deuxième phosphorylation articulée sur le cytochrome b est assurée.

Notre travail a permis également de montrer une activité complémentaire des produits thyroïdiens et de Ca^{++} sur la respiration des mitochondries hépatiques. L'ion calcium provoque une activation de la respiration et une oxydation du NAD qui se maintient tant que dure la fixation du cation par les particules. Les hormones thyroïdiennes ajoutées à la suspension mitochondriale à des doses suffisamment élevées produisent un effet semblable mais irréversible. Or, nous avons trouvé que T_3 ou TA_3 , même à des concentrations n'entraînant par elles-mêmes aucune influence respiratoire, modifient la réponse à l'addition de Ca^{++} en supprimant son caractère cyclique par une activation continue de la consommation d'oxygène et une oxydation totale du NAD^+ , cet effet apparaît quel que soit l'ordre d'addition de Ca^{++} et des iodothyronines. Ainsi, il ressort de nos expériences, que la présence dans le milieu d'incubation de Ca^{++} et de T_3 ou TA_3 , à des concentrations n'exerçant qu'un effet transitoire pour les uns et nul pour les autres, provoque une activation de la respiration et une oxydation continue du NAD^+ .

Comment ces résultats peuvent-ils s'interpréter à la

lumière de nos connaissances actuelles sur les mécanismes des phosphorylations oxydatives conduisant à la biosynthèse de l'ATP, au sujet de laquelle deux conceptions, étayées sur des faits expérimentaux différents, s'opposent ? L'une dénie l'existence d'étapes de conservation de l'énergie, l'autre au contraire admet une ou deux étapes de couplage précédant l'intégration du phosphate.

La première est celle de MITCHELL (120, 121, 122, 123) qui propose pour expliquer la synthèse de l'ATP une théorie chémoosmotique. L'oxydation des substrats serait couplée à la translocation des protons au travers de la membrane mitochondriale et ce serait le courant protonique qui permettrait le couplage de l'oxydoréduction à la phosphorylation. Avec les mitochondries intactes, le flux des protons est dirigé vers l'extérieur, comme l'a établi MITCHELL grâce à des mesures sensibles de pH. De plus, la concentration entre ions H^+ apparus, PO_4^{3-} et oxygène consommé lui a permis de trouver que les rapports H^+/O et H^+/P sont en accord avec les valeurs de P/O déterminés avec les substrats liés au NAD^+ et avec le succinate. L'hydrolyse de l'ATP amène aussi la translocation de protons et le rapport H^+ sur phosphate libéré est conforme aux données classiques. Ces résultats ne sont pas compatibles avec l'existence des dérivés de couplage, aussi MITCHELL conteste-t-il leur réalité, d'autant plus qu'ils n'ont jamais été isolés.

Par contre la seconde conception défendue par de nombreux auteurs réfute celle basée sur les relations chémoosmotiques et admet l'existence d'intermédiaires chimiques énergétiques au cours de la synthèse de l'ATP. LEHNINGER (94, 95) considérerait initialement une seule étape tandis que CHANCE (30) en envisage deux. Ce dernier dans un travail récent (36)

a apporté de nouveaux éléments qui s'opposent à la théorie de MITCHELL. Les variations de pH constatées au cours de la synthèse de l'ATP par les mitochondries ont été suivies à l'aide de divers colorants par enregistrement avec des instruments très sensibles. L'emploi de bleu de bromothymol et de pourpre de bromocrésol a permis de suivre les changements très rapides de pH intra et extramitochondriaux. Or avec les mitochondries fortement couplées, il n'a été observé aucun changement suffisamment rapide dans la concentration des ions H^+ , compatible avec les réactions de transfert d'hydrogène ou d'électrons. D'après CHANCE, les mesures réalisées par MITCHELL pour étayer la théorie chémootmotique n'ont porté en fait que sur des phénomènes lents en rapport avec des modifications d'état d'équilibre mais non avec le transfert des électrons le long des chaînes respiratoires. En outre, pour SLATER, l'intervention des intermédiaires de couplage doit être tellement brève qu'il n'est pas étonnant que ceux-ci n'aient jamais été isolés.

Pour notre part, les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail, s'opposent également à la théorie chémootmotique et s'expliquent par la conception énergétique. En effet, comme l'oligomycine et la rutamycine ne suppriment pas le gonflement mitochondrial induit par les dérivés thyroïdiens comme par Ca^{++} , il est nécessaire d'admettre que ces produits agissent avant les antibiotiques sur une étape précédant la prise du phosphate. En outre, le fait que le DNP n'exerce aucune action hypertrophiante et surtout qu'il inhibe même la fixation d'eau par les particules en présence de produits thyroïdiens, est en désaccord avec les vues de MITCHELL et est en faveur de l'existence de deux intermédiaires de couplage, le premier étant le site d'action du DNP et le second vraisemblablement celui des hormones thyroïdiennes et de Ca^{++} . On ne

comprendrait pas, en effet, pourquoi deux agents possédant un site d'action voisin, comme les découplants vrais et les produits thyroïdiens qui devraient donc tous deux s'opposer au courant protonique, interviennent de façon contraire bien qu'ils augmentent la consommation d'oxygène des particules isolées.

Dans ces conditions, il semble donc qu'il y ait compétition entre Ca^{++} et les produits hormonaux vis-à-vis de l'intermédiaire énergétique $\text{X} \sim \text{I}$, comme le désigne CHANCE (schéma E). Cependant, les iodothyronines exigent pour agir que la deuxième phosphorylation soit assurée, cette compétition ne doit avoir lieu qu'au niveau de l'intermédiaire articulé sur la région respiratoire délimitée par les cytochromes b, c_1 , c. Il se formerait dans les crêtes mitochondriales au cours de la captation, du cation, un complexe $(\text{X} \sim \text{I})\text{Ca}_2$ précédant la précipitation d'hydroxyapatite. Parallèlement à cette précipitation X et I sont libérés et utilisent, pour régénérer $\text{X} \sim \text{I}$, l'énergie respiratoire, ce qui explique l'activation de la respiration et l'oxydation du NAD^+ accompagnant la captation du cation avec retour à l'état initial dès que Ca^{2+} a disparu du milieu d'incubation.

Les produits thyroïdiens produiraient sans doute la scission du complexe $(\text{X} \sim \text{I})\text{Ca}_2$ relibérant Ca^{++} . On conçoit dès lors que le cation ne pouvant plus s'accumuler, $\text{X} \sim \text{I}$ soit constamment scindé puis régénéré, expliquant ainsi l'activation continue de la respiration et l'oxydation totale du NAD^+ en présence de Ca^{++} et d'hormones thyroïdiennes.

Cette influence réciproque entre T_4 et Ca^{++} qui se manifeste parfois par un effet additif, parfois antagoniste

correspond dans une certaine mesure à ce que l'on constate chez l'homme dans certaines manifestations pathologiques.

BIBLIOGRAPHIE

~:-

- 1 - AEBI H. et ABELIN I.
Biochem. Z., 324, 364, 1953.
- 2 - AHMAD K., SCHNEIDER H.G. et LTRONG F.M.
Arch. Biochem., 28, 281, 1950.
- 3 - ALBERT A. et KEATING F.R.
Endocrinology, 51, 427, 1952.
- 4 - ALEXANDER W.D. et BISSET S.K.
Lancet, 2, 1265, 1958.
- 5 - AUB J.C., BAUER W., HEATH et ROPES M.C.
J. Clin. Invest., 7, 97, 1929.
- 6 - AVI-DOR Y.
Biochim. Biophys. Acta, 39, 53, 1960.
- 7 - BAIN J.A.
J. Pharmacol., 110, 2, 1954.
- 8 - BARKER S.B.
Physiol. Rev., 31, 205, 1951.
- 9 - BARKER S.B. et LEWIS W.J.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 91, 650, 1956.
- 10 - BAUER W. et KRANE S.M.
"The Thyroid" (S.C. WERNER Ed.) p.624, 776 - HOEBER,
HARPER et ROW, New-York, 1962.
- 11 - BEYER R.E., LOW H. et ERNSTER L.
Acta. Chem. Scand., 10, 1039, 1956.

- 12 - BEYER R.E., LAMBERT S.L. et NEYMAN M.A.
Can. J. Biochem. Physiol., 39, 73, 1960.
- 13 - BRIERLEY G.P., BACHMANN E. et GREEN D.E.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 48, 1928, 1962.
- 14 - BRIERLEY G.P.
Johnson Found. Colloq. Energy-linked Functions
Mitochondria, Philadelphia, 1963, p.237, - CHANCE B.
Editeur - Academic Press, New-York.
- 15 - BRIERLEY G.P., MURER E. et GREEN D.E.
Science, 140, 60, 1963.
- 16 - BRIERLEY G.P., MURER E. et O'BRIEN R.L.
Biochim. Biophys. Acta, 88, 645, 1964.
- 17 - BRONK J.R.
Biochim. Biophys. Acta, 37, 327, 1960.
- 18 - BRONK J.R.
Feder. Proc., 21, 53, 1962.
- 19 - BRONK J.R.
Biochim. Biophys. Acta, 69, 375, 1963.
- 20 - BRUNI A., AZZONE C.F.
Biochim. Biophys. Acta, 93, 462, 1964.
- 21 - CAPLAN A.I. et CARAFOLI E.
Biochim. Biophys. Acta, 104, 317, 1965.
- 22 - CARAFOLI E., WEILAND J. et LEHNINGER A.L.
Biochim. Biophys. Acta, 97, 88, 1965.
- 23 - CARAFOLI E.
Biochim. Biophys. Acta, 97, 99, 1965.
- 24 - CARAFOLI E.
Biochim. Biophys. Acta, 97, 107, 1965.

25 - CATEL W.

Klin. Wochschr., 17, 574, 1938.

26 - CAUGHEY W.S., SMILEY J.D. et HELLERMAN L.

J. Biol. Chem. 224, 591, 1957.

27 - CHANCE B.

Rev. Sci. Instr., 22, 619, 1951.

28 - CHANCE B.

Science, 120, 767, 1954.

29 - CHANCE B., WILLIAMS G.R.

J. Biol. Chem. 217, 409, 1955.

30 - CHANCE B. et WILLIAMS G.R.

Adv. Enzymol., 17, 65, 1956.

31 - CHANCE B. et PACKER L.

Biochem. J. 68, 295, 1958.

32 - CHANCE B.

"Ciba Foundation Symposium on the Regulation of cell Metabolism" - Ed. WOLSTENHOLME G.E.W. et O'CONNOR C.M., p.91 - Boston, 1959.

33 - CHANCE B., HAGIHARA B.

"Proceedings of the fifth international congress of biochemistry" - Moscou, 1961, vol. 5, Pergamon Press, Oxford, 1963, p.3.

34 - CHANCE B.

Johnson Found. Colloq. Energy-linked functions Mitochondria, Philadelphia, p. 253 - Editeur CHANCE B., Academic Press, New-York, 1963.

35 - CHANCE B.

J. Biol. Chem. 240, 2729, 1965.

36 - CHANCE B.

Third FEBS Meeting, Warsaw, 1966 (Abstract M 4) - Academic Press, New-York.

- 37 - CHAPPEL J.B. et GREVILLE G.D.
Nature, 182, 813, 1958.
- 38 - CHAPPEL J.B. et GREVILLE G.D.
Nature, 183, 1737, 1959.
- 39 - CHAPPEL J.B. et GREVILLE G.D.
Biochim. Biophys. Acta, 38, 483, 1960.
- 40 - CHAPPEL J.B., GREVILLE G.D. et BICKNELL K.E.
Biochem. J., 84, 61, 1962.
- 41 - CHAPPEL J.B., COHN M. et GREVILLE G.D.
Johnson Found. Colloq. Energy-linked Functions
Mitochondria, Philadelphia, p.219. - Editeur CHANCE B.,
Academic Press, New-York, 1963.
- 42 - CLAUSEN S.W. et Mc COORD A.B.
J. Pediat., 13, 655, 1938.
- 43 - CLELAND K.W.
Nature, 170, 497, 1952.
- 44 - COOPER C. et LEHNINGER A.L.
J. Biol. Chem. 219, 489, 1956.
- 45 - DAVIES P.W. et BRONK F.
Rev. Sci. Instr., 13, 524, 1942.
- 46 - De LUCA H.F. et ENGSTROM G.W.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 47, 1744, 1961.
- 47 - De LUCA H.F., ENGSTROM G.W. et RASMUSSEN H.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 48, 1604, 1962.
- 48 - DICKENS F. et SALMONY D.
Biochem. J., 64, 645, 1956.
- 49 - DRILL V.A.
Physiol. Rev., 23, 355, 1943.

50 - DRILL V.A.

"The Thyroid" (S.C. WERNER Ed.p) p.607 et 761 -
HARPER et ROW, New-York, 1962.

51 - DUTOIT C.H.

"Phosphorus metabolism" - Ed. Mc ELROY W.O. et GLASS B.
Vol. II, p.597 - Baltimore, Johns Hopkins Press.

52 - EMMELOT P., et BOS C.J.

Exptl. Cell. Research., 12, 191, 1957.

53 - EMMELOT P. et BOS C.J.

Exptl. Cell. Research., 14, 132, 1957.

54 - ERNSTER L. et LEE C.P.

Ann. Rev. Biochem., 33, 729, 1964.

55 - FAIRHURST A.S., ROBERTS J.C. et SMITH R.E.

Amer. J. Physiol., 197, 370, 1959.

56 - FLEURY P. et EBERHARD R.

Ann. Biol. Clin. 9, 453, 1951.

57 - FOLLIS R.H.

Bull. Johns Hopkins Hosp., 92, 405, 1953.

58 - GALTON V.A. et INGBAR S.H.

Endocrinology, 68, 435, 1961.

59 - GOTTERER G.S., THOMPSON T.E. et LEHNINGER A.L.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 15, 1961.

60 - GREENAWALT J., ROSSI C.S. et LEHNINGER A.L.

J. Cell. Biol., 23, 21, 1964.

61 - HEIMBERG M., PARK J.H., ISAACS A. et PITT-RIVERS R.

Endocrinology, 57, 756, 1955.

62 - HOCH F.L. et LIPMANN F.

Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 40, 909, 1954.

- 63 - HOCH F.L.
Physiol. Rev., 42, 605, 1962.
- 64 - HOCH F.
New Engl. J.Med., 266, 446, 498, 1962.
- 65 - HONDA S.I., MUENSTER A.M.
Arch. Biochem. Biophys., 88, 118, 1960.
- 66 - HUIJING F. et SLATER E.C.
J. Biochem., 49, 493, 1961.
- 67 - HUNTER F.E. et FORD L.
J. Biol. Chem., 216, 357, 1955.
- 68 - HUNTER F.E., DAVIS J. et CARLET L.
Biochim. Biophys. Acta, 20, 237, 1956.
- 69 - HUNTER F.E.
"Biological Structure and Function" - Vol. II, Acad.
Press 1961, T.W. GOODWIN and O. LINDBEY Ed., p.53.
- 70 - KENDALL E.C.
Endocrinology, 3, 156, 1918.
- 71 - KIELLEY W.W. et KIELLEY R.K.
J. Biol. Chem. 200, 213, 1953.
- 72 - KIELLEY W.W. et BRONK J.R.
J. Biol. Chem., 230, 521, 1958.
- 73 - KLEMPERER H.G.
Biochem. J., 60, 122, 1955.
- 74 - KLEMPERER H.G.
Biochem. J., 60, 128, 1955.
- 75 - KOCH A.L.
Biochim. Biophys. Acta, 51, 429, 1961.

- 76 - KRANE S.M., BROWNELL G.L., STANBURY J.B. et CORRIGAN H.
J. Clin. Invest., 35, 874, 1956.
- 77 - LARDY H.A. et FELDOTT G.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 54, 636, 1951.
- 78 - LARDY H.A., et MALEY G.F.
J. Biol. Chem. 204, 435, 1953.
- 79 - LARDY H.A., MALEY G.F.
J. Biol. Chem., 204, 435, 1954.
- 80 - LARDY H.A. et MALEY G.F.
Recent. Progr. Hormone Res., 10, 129, 1954.
- 81 - LARDY H.A.
Endocrinology, 57, 566, 1955.
- 82 - LARDY H.A.
Proc. Third Int. Cong. Biochem. Bruxelles, 1955,
sect. 7, 287, 1956.
- 83 - LARDY H.A., JOHNSON D. et Mc MURRAY W.C.
Arch. Biochem. Biophys. 78, 587, 1958.
- 84 - LAYNE E.
"Methods in Enzymology", COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O.
Ed., Acad. Press, New York, vol.3, p.450.
- 85 - LEHNINGER A.L.
"Enzymes : Units of biological structure and function".
GAEBLER O.H. Ed., New York, Academic Press 1956, p.217.
- 86 - LEHNINGER A.L. et RAY B.L.
Biochim. Biophys. Acta, 26, 643, 1957.
- 87 - LEHNINGER A.L.
J. Biol. Chem. , 234, 2186, 1959.
- 88 - LEHNINGER A.L.
J. Biol. Chem., 234, 2459, 1959.

- 89 - LEHNINGER A.L.
J. Biol. Chem., 234, 2465, 1959.
- 90 - LEHNINGER A.L., RAY B.L. et SCHNEIDER M.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 5, 97, 1959.
- 91 - LEHNINGER A.L.
Science, 128, 450, 1960.
- 92 - LEHNINGER A.L.
Fed. Proc., 19, 952, 1960.
- 93 - LEHNINGER A.L.
Biochmi. Biophys. Acta, 51, 442, 1961.
- 94 - LEHNINGER A.L.
"Biological structure and function" - GOODWIN T.W.
et LINDBERG O. Ed., Acad. Press, London et New York,
1961, vol.2, p.31.
- 95 - LEHNINGER A.L. et WADKINS C.L.
Ann. Rev. Biochem. 31, 47, 1962.
- 96 - LEHNINGER A.L.
"Horizons in Biochemistry", p.421, KASHA M. et
PULLMAN B. Ed., Academic Press, New York London, 1962.
- 97 - LEHNINGER A.L., ROSSI C.S. et GREENAWALT J.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 444, 1963.
- 98 - LEHNINGER A.L.
"The Mitochondrion", p.159, BENJAMIN W.A. Ed. New York
Amsterdam, 1964.
- 99 - LINDBERG O. et ERNSTER L.
Nature, 173, 1038, 1954.
- 100 - LINDBERG O., LOW H., CONOVER T.E. et ERNSTER L.
"Biological structure and function", GOODWIN T.W. and
LINDBERG O. Ed., Vol.2, p.3, New York, Academic Press.

- 101 - LIPSETT M.N.N. et CORWIN L.M.
J. Biol. Chem. 234, 2448, 1959.
- 102 - LISSITZKI S., BENEVENT M.T., ROQUES M. et ROCHE J.
Bull. Soc. Chim. Biol., 41, 1329, 1959.
- 103 - LOWE C.E., BIRD E.D. et THOMAS W.C.
J. Clin. Endocrinol.-Metab., 22, 261, 1962.
- 104 - LOWRY O.H. et LOPEZ J.A.
J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
- 105 - Mc FARLANE M.G. et SPENCER A.G.
Biochem. J., 54, 569, 1953.
- 106 - Mc KERNS H.W.
Biochim. Biophys. Acta, 62, 402, 1962.
- 107 - Mc LAGAN N.F. et WILKINSON J.H.
Biochem. J., 56, 211, 1954.
- 108 - Mc LAGAN N.F. et WILKINSON J.H.
Biochem. J., 59, 21, 1955.
- 109 - Mc MURRAY W.C., JOHNSON D. et LARDY H.A.
Arch. Biochem. Biophys., 78, 587, 1958.
- 110 - MALAMED S. et RECKNAGEL R.O.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 139, 1958.
- 111 - MALAMED S. et RECKNAGEL R.O.
J. Biol. Chem., 234, 3027, 1959.
- 112 - MALEY G.F. et LARDY H.A.
J. Biol. Chem., 215, 377, 1955.
- 113 - MALEY G.F.
Amer. J. Physiol., 188, 35, 1957.
- 114 - MARTIN J.B. et DOTY D.M.
Anal. Chem., 21, 965, 1949.

- 115 - MARTIUS C. et HESS B.
Biochem. Z., 326, 191, 1955.
- 116 - MICHEL R., et ETLING N.
C.R. Soc. Biol., 151, 36, 1957.
- 117 - MICHEL R., RALL J.E., MICHEL O., GIRARD M. et VARRONE S.
Biochim. Biophys. Acta, 71, 494, 1963.
- 118 - MICHEL R.
"Exposés annuels de biochimie médicale" -
MASSON Ed., 1964, Paris, p.59.
- 119 - MICHEL R., ROCHE J., MICHEL O., GIRARD M. et RALL J.E.
J. Biol. Chem., 239, 3062, 1964.
- 120 - MITCHELL P.
Nature, 191, 144, 1961.
- 121 - MITCHELL P.
Biochem. Soc. Symp., 22, 142, 1962.
- 122 - MITCHELL P. et MOYLE J.
Nature, 208, 147, 1965.
- 123 - MITCHELL P. et MOYLE J.
Nature, 208, n°5016, 1965.
- 124 - MITCHELL P.
Biol. Rev., 41, 3, 1966.
- 125 - MUDD S.H., PARK J.H. et LIPMANN F.
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 41, 571, 1955.
- 126 - NIELSEN H.
Acta. Med. Scand. Suppl. 266, 783, 1952.
- 127 - PACKER L.
J. Biol. Chem., 235, 242, 1960.

128 - PACKER L.

"Biological structure and function", vol. II,
T.W. GOODWIN et O. LINDBERG Ed., 1961, p.85.

129 - PACKER L.

J. Biol. Chem. 236, 214, 1961.

130 - PACKER L.

J. Biol. Chem., 237, 1327, 1962.

131 - PACKER L.

"Energy-linked functions of mitochondria",
CHANCE B. Ed., Academic Press, New York London,
p.51, 1963.

132 - PENEFSKY H.S., PULLMAN M.E., DATTA A. et ROCKER E.

J. Biol. Chem., 235, 3330, 1960.

133 - PITT-RIVERS R. et TATA J.R.

"The Thyroid Hormones", Pergamon Press, London 1959.

134 - POTTER V.R. et REIF A.E.

J. Biol. Chem., 194, 287, 1952.

135 - POTTER V.R., SIEKEVITZ P. et SIMONSON H.C.

J. Biol. Chem. 205, 893, 1953.

136 - PRICE C.A., FONNESU A. et DAVIES R.E.

Biochem. J., 64, 754, 1956.

137 - RAAFLAUB J.

Helv. Physiol. Acta, 11, 142, 1957.

138 - RACKER E.

"Advances in Enzymology", NORD F.F. Ed., vol.23,
p.323, New York ; Interscience, 1961.

139 - RALL J.E., ROCHE J., MICHEL R., MICHEL O. et VARRONE S.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 111, 1962.

140 - RALL J.E., ROCHE J., MICHEL R., MICHEL O. et VARRONE S.

Biochim. Biophys. Acta, 62, 622, 1962.

- 141 - RALL J.E., MICHEL R., ROCHE J., MICHEL O. et VARRONE S.
J. Biol. Chem. 238, 1848, 1963.
- 142 - REMMERT L.F. et LEHNINGER A.L.
Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 45, 1, 1959.
- 143 - RIML O. et WOLFF H.G.
Arch. Exp. Path. Pharmac., 157, 178, 1930.
- 144 - ROBBINS J. et RALL J.E.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 81, 530, 1952.
- 145 - ROCHE J., DELTOUR G.H. et MICHEL R.
C.R. Soc. Biol., 147, 385, 1953.
- 146 - ROCHE J., WOLF W.
C.R. Soc. Biol., 149, 1604, 1955.
- 147 - ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P. et WOLF W.
Endocrinology, 59, 425, 1956.
- 148 - ROCHE J., MICHEL R., STUTZEL M. et POILLOT B.
C.R. Soc. Biol., 155, 2293, 1961.
- 149 - ROCHE J., RALL J.E., MICHEL R., MICHEL O. et VARRONE S.
Biochim. Biophys. Acta, 56, 188, 1962.
- 150 - ROCHE J., MICHEL R. et KAMEI T.
Biochim. Biophys. Acta, 61, 647, 1962.
- 151 - ROCHE J., RALL J.E., MICHEL R., MICHEL O. et VARRONE S.
C.R. Soc. Biol., 156, 824, 1962.
- 152 - ROCHE J., MICHEL R., et KAMEI T.
C.R. Soc. Biol. 156, 1236, 1962.
- 153 - ROCHE J., MICHEL R., RALL J.E., MICHEL O., GIRARD M.
et VARRONE S.
Biochim. Biophys. Acta, 71, 494, 1963.

- 154 - ROCHE J., MICHEL R. et LEBLANC A.
C.R. Acad. Sci. Paris, 260, 1497, 1965.
- 155 - ROODYN D.B., FREEMAN K.B. et TATA J.R.
Biochem. J., 94, 628, 1965.
- 156 - ROSSI C.S. et LEHNINGER A.L.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 11, 441, 1963.
- 157 - ROSSI C.S. et LEHNINGER A.L.
Biochem. Z., 338, 698, 1963.
- 158 - ROSSI C.S., et LEHNINGER A.L.
J. Biol. Chem. 239, 3971, 1964.
- 159 - SALLIS J.D., De LUCA H.F. et RASMUSSEN H.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 266, 1963.
- 160 - SALVATORE G.
"Exposés annuels de Biochimie Médicale", MASSON Ed.,
Paris, 1964, p.45.
- 161 - SANADI D.R.
Ann. Rev. Biochem., 34, 21, 1965.
- 162 - SCHAW W.V., LANNON T.J. et TAPLEY D.P.
Biochim. Biophys. Acta, 36, 499, 1959.
- 163 - SCHNEIDER W.C.
J. Biol. Chem., 176, 239, 1948.
- 164 - SCHNEIDER W.C. et HOGEBOOM G.H.
J. Biol. Chem., 183, 123, 1950.
- 165 - SICKEVITZ P., POTTER V.R.
J. Biol. Chem., 215, 221, 1955.
- 166 - SILVER S., et REINER M.
Bull. N.Y. Acad. Med., 26, 277, 1950.

- 167 - SLATER E.C.
Symp. Soc. Exptl. Biol., 10, 110, 1957.
- 168 - SLATER E.C. et HULSMANN W.C.
Ciba Foundation Symposium on the Regulation of Cell Metabolism. WOLSTENHOLME G.E.W. et O'CONNOR C.M. Ed., p.58, Boston, Little Brown 1959.
- 169 - SLATER E.C.
Proc. Intern. Cong. Biochem., 5 th, Moscou, 1961, p.325. SLATER E.C. Ed., Pergamon Press, Oxford 1963.
- 170 - SMITH R.H. et WILLIAMS-ASHMAN H.G.
Biochim. Biophys. Acta, 7, 295, 1951.
- 171 - SOKOLOFF L., KAUFMAN S. et GELBOIN H.V.
Biochim. Biophys. Acta, 52, 410, 1961.
- 172 - SOKOLOFF L., et KAUFMAN S.
J. Biol. Chem., 236, 795, 1961.
- 173 - STURM A., WERNITZ W.
Klin. Wschr., 34, 93, 1956.
- 174 - SURUTSH IN A., CORDONNIER J.K. et LANG S.
Amer. J. Physiol. 188, 503, 1957.
- 175 - TAPLEY D.F., COOPER C. et LEHNINGER A.L.
Biochim. Biophys. Acta, 18, 597, 1955.
- 176 - TAPLEY D.F. et COOPER C.
J. Biol. Chem., 242, 341, 1956.
- 177 - TAPLEY D.F.
J. Biol. Chem., 222, 325, 1956.
- 178 - TATA J.R.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95, 362, 1957.
- 179 - TATA J.R.
Biochem. J., 77, 214, 1960.

- 180 - TATA J.R.,
Recent Prog. Hormone Res., 18, 221, 1962.
- 181 - TATA J.R.
Nature, 197, 1167, 1963.
- 182 - TATA J.R.
"Exposés annuels de Biochimie Médicale" -
MASSON Ed., Paris, 25, 45, 1964.
- 183 - TATA J.R. et WIDNELL C.C.
Biochem. J., 98, 604, 1966.
- 184 - TAUROG A. et CHAIKOFF I.L.
J. Biol. Chem., 171, 439, 1948.
- 185 - TEDESCHI H. et HARRIS D.L.
Arch. Biochem. Biophys., 58, 52, 1955.
- 186 - TEDESCHI H. et HARRIS D.L.
Biochim. Biophys. Acta, 28, 392, 1958.
- 187 - THIBAUT O.
C.R. Soc. Biol., 149, 877, 1955.
- 188 - THIBAUT O. et PITT-RIVERS R.
Lancet, 1, 285, 1955.
- 189 - THOMPSON R.Q., HOEH M.M. et HIGGENS C.E.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p.474, mai 1961.
- 190 - THORN M.B.
Biochem. J., 63, 420, 1956.
- 191 - VASINGTON F.D. et MURPHY J.V.
Fed. Proc., 20, 146, 1961.
- 192 - VASINGTON F.D. et MURPHY J.V.
J. Biol. Chem., 237, 2670, 1962.

- 193 - VASINGTON F.D.
J. Biol. Chem., 238, 1841, 1963.
- 194 - WATANABE M.I. et WILLIAMS C.M.
J. Gen. Physiol. 37, 71, 1953.
- 195 - WILLIAMS R.H. et MORGAN H.J.
Inter. Clin. 2, 48, 1940.
- 196 - WISWELL J.G. et ASPER S.P.
Bull. Johns Hopk. Hospital, 102, 115, 1958.
- 197 - WITTER R.F. et COTTONE M.A.
Biochim. Biophys. Acta, 22, 364, 1956.
- 198 - WOJTEZAK L. et LEHNINGER A.L.
Biochim. Biophys. Acta, 51, 442, 1961.
- 199 - WOLFF E.C., BALL E.C.
J. Biol. Chem., 224, 1083, 1957.
- 200 - WOLFF J., WOLFF E.C.
Fed. Proc., 15, 387, 1956.
- 201 - WOLFF J. et WOLFF E.C.
Biochim. Biophys. Acta, 26, 387, 1957.
- 202 - WOLFF J.
J. Biol. Chem. 237, 230, 1962.
- 203 - WOLFF J.
J. Biol. Chem. 237, 236, 1962.

